

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

Estudio sobre el papel de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en la
neuroinflamación inducida por estrés

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Silvia Zoppi

Directores

Borja García-Bueno
Juan Carlos Leza

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología

ESTUDIO SOBRE EL PAPEL DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES CB1 Y CB2 EN LA NEUROINFLAMACIÓN INDUCIDA POR ESTRÉS

Tesis Doctoral

SILVIA ZOPPI

Directores de Tesis:

Borja García-Bueno

Juan Carlos Leza

Julio 2012

A mio nonno Sandro

En primer lugar quiero agradecer a mi Director de Tesis Juan Carlos Leza, que me dió la posibilidad de entrar en su grupo, lo que para mí ha representado una oportunidad muy grande; le agradezco haberme ayudado, dirigido en mi Tesis y aconsejado de manera siempre eficaz y de buen humor, para mí ha sido un ejemplo como científico y como persona, no podía esperar mejor jefe.

Al Doctor Borja García-Bueno, mi otro Director de Tesis, le agradezco muchísimas cosas, antes de todo por haberme permitido la realización de este trabajo, nunca habría llegado hasta aquí sin toda su ayuda, apoyo y consejos que me han permitido avanzar durante estos años. Le agradezco por haber corregido mis despistes con infinita paciencia, por su trato y por las muchísimas cosas que he aprendido de él, me siento muy afortunada que haya sido mi director de Tesis.

Al Doctor Pedro Lorenzo por su presencia, su amabilidad y por las palabras de cariño que siempre nos ha proporcionado en el laboratorio.

Al Doctor José Luis Muñoz Madrigal y al Doctor Javier Caso, por su ayuda y consejos en el laboratorio y por ser buenos compañeros de trabajo.

A mis compañeras Bea, Iciar, Karina, Ara y Sandra, por su compañía, su ayuda, por haber contribuido en hacer muy amenos estos años de la Tesis, le agradezco haberme ayudado en el laboratorio cada vez que lo he necesitado; el cariño que le tengo ahora a España es lo que tengo hacia todas vosotras, muchas gracias por todo lo que me habéis transmitido y enseñado en todo momento.

A la secretaria del Departamento María Elena por solucionar el papeleo y la burocracia, al personal del Animalario, a todos los becarios y a los técnicos del Departamento por haber facilitado la realización de mis experimentos.

Al Doctor Jorge Manzanares de la Universidad Miguel Hernández de Alicante, por habernos proporcionado animales transgénicos.

I would like to thank Dr Francis Chalouff for giving me the opportunity to work in his lab and for his advice and help during my time in Bordeaux; thanks also goes to Dr Isabelle Matias for helping me in the endocannabinoids experiment and to the entire team of Dr Giovanni Marsicano for welcoming me in their lab.

Al CIBERSAM por el apoyo económico que ha permitido la realización de esta Tesis doctoral. En cuanto a la financiación del material necesario, ha sido posible con las instituciones que durante estos 4 años han colaborado con el laboratorio del Prof. Leza: UCM, CANNAB-CM, FIS (ISCIH), IIS - IMAS 12, IUINQ-UCM.

A tutta la mia famiglia per il supporto che mi ha permesso arrivare fin qui.

CONTENIDOS

Abreviaturas	VII
Summary	XIII

PARTE I - INTRODUCCIÓN

1 El estrés: generalidades	3
1.1 El eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA)	4
1.2 Sistema catecolaminérgico	6
1.3 Sistema serotoninérgico	7
1.4 Sistema gabérgico	7
1.5 Sistema opioide	8
2 Mediadores del estrés	9
2.1 Glucocorticoides	9
2.2 Glutamato	12
2.3 Mediadores inflamatorios	13
3 Estrés y patologías	16
3.1 Estrés y neuropatologías	16
3.1.1 Estrés y patologías Neurológicas/Neurodegenerativas	16
3.1.2 Estrés y patologías Neuropsiquiátricas	18
3.1.3 Estrés y depresión	19
4 Bioquímica del sistema cannabinoide	21
4.1 Receptores cannabinoides	22
4.1.1 Distribución de los receptores CB1	23
4.1.2 Distribución de los receptores CB2	24
4.1.3 Candidatos a receptores cannabinoides	25
4.2 Mecanismos de transducción de señal activados por receptores cannabinoides	29
4.2.1 Adenilil ciclasa	29
4.2.2 Canales iónicos	30
4.2.3 Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)	31
4.2.4 Producción de óxido nítrico	32
4.2.5 Fosfolipasa D (PLD) y fosfolipasa A ₂ (PLA ₂)	32
4.2.6 Regulación de la expresión de genes	32
5 Farmacología de los cannabinoides	34
5.1 Endocannabinoides	34
5.2 Fitocannabinoides	37

5.3	Ligandos sintéticos	38
5.4	Agonistas de receptores cannabinoides	38
5.4.1	Cannabinoides clásicos	39
5.4.2	Cannabinoides no clásicos	39
5.4.3	Aminoalquilindoles	39
5.4.4	Eicosanoides	39
6	Mecanismo de inactivación de endocannabinoides	41
6.1	Recaptación de endocannabinoides	41
6.2	Hidrólisis de AEA	42
6.3	Hidrólisis de 2-AG	43
6.4	Otros mecanismos de inactivación endocannabinoide	45
7	Antagonistas de receptores cannabinoides	46
8	Efectos y mecanismos neuroprotectores de los cannabinoides	47
8.1	Efecto antiglutamatérgico	48
8.2	Disminución del flujo intracelular de calcio	48
8.3	Propiedades antioxidantes	48
8.4	Control del sistema vascular	49
8.5	Efecto antiinflamatorio	49
9	Cannabinoides y estrés	51
10	Antecedentes inmediatos	54

PARTE II - HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1	Hipótesis	59
2	Objetivos	60

PARTE III - MATERIAL Y MÉTODOS

1	Modelo experimental	65
1.1	Animales	65
1.2	Estrés por inmovilización	66
1.3	Justificación del modelo	67
2	Obtención de muestras, métodos y estadística	69
2.1	Herramientas farmacológicas	69

2.2	Obtención de extractos nucleares y citosólicos de muestras de tejido cerebral.	71
2.3	Análisis por Western Blot	71
2.4	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (Q-PCR)	73
2.5	Preparación de sinaptosomas	74
2.6	Cuantificación del transporte de glutamato: recaptación sinaptosomal de glutamato	74
2.7	Niveles de corticosterona plasmática	75
2.8	Cuantificación de MCP-1	75
2.9	Grado de peroxidación lipídica	75
2.10	Niveles de PGE ₂	76
2.11	Concentración de los metabolitos estables del óxido nítrico: nitritos (NO ₂ ⁻)	77
2.12	Análisis del contenido endocannabinoide	77
2.13	Extracción de tejido fijado para estudios microscópicos	77
2.14	Inmunofluorescencia	78
2.15	Cuantificación del contenido proteico	79
2.16	Análisis estadístico	79

PARTE IV - RESULTADOS

1	Receptor cannabinoide CB1 y excitotoxicidad/ neuroinflamación inducidas por estrés	83
1.1	Expresión de CB1 en corteza cerebral de ratón control y tras estrés agudo; Mecanismos relacionados con el glutamato	83
1.2	Efectos CB1-dependentes sobre la recaptación sinaptosomal de glutamato y sobre la expresión de sus transportadores/recaptadores	85
1.3	Efectos antiinflamatorios provocados por la activación de CB1: Mecanismos implicados	87
1.3.1	Niveles de corticosterona plasmática	87
1.3.2	Citocinas proinflamatorias y quemoquinas	88
1.3.3	Factor nuclear κ B(NF κ B).	89
1.3.4	Enzimas proinflamatorias NOS-2 y COX-2 y niveles de PGE ₂	90
1.3.5	Peroxidación lipídica	90
1.4	Modulación CB1 dependiente de la vía antiinflamatoria L-PGDS/15d-PGJ ₂ /PPAR γ	92
1.5	Comprobación de que los efectos antiexcitotóxicos/antiinflamatorios de ACEA son dependientes de CB1	93
2	Receptor cannabinoide CB2 y excitotoxicidad/ neuroinflamación inducidas por estrés	95
2.1	Expresión de CB2 en corteza cerebral tras estrés agudo	95

2.2	Recaptación de glutamato	99
2.3	Efectos antiinflamatorios provocados por la activación de CB2	99
2.3.1	Niveles de corticosterona plasmática	100
2.3.2	Citocinas proinflamatorias y quemoquinas: TNF- α y MCP-1	100
2.3.3	NF- κ B	102
2.3.4	Expresión de NOS-2 y COX-2 y niveles de PGE ₂	103
2.3.5	Peroxidación lipídica (MDA) y concentración de los metabolitos estables del óxido nítrico: nitritos (NO ₂ ⁻)	105
3	Ratones CB2 KO y excitotoxicidad/ neuroinflamación inducidas por estrés	106
3.1	Recaptación de glutamato	106
3.2	Ratones CB2 KO y neuroinflamación	106
3.2.1	Niveles de corticosterona plasmática	106
3.2.2	Citocinas proinflamatorias y quemoquinas	107
3.2.3	NF- κ B	108
3.2.4	Expresión de NOS-2 y COX-2 y niveles de PGE ₂	109
3.2.5	Peroxidación lipídica (MDA) y concentración de los metabolitos estables del óxido nítrico: NO ₂ ⁻	110
4	Exposición a estrés repetido y endocannabinoides	111
4.1	Niveles de endocannabinoides en corteza prefrontal tras estrés repetido	111
4.2	Enzimas de síntesis y degradación endocannabinoide en corteza prefrontal tras estrés repetido	112

PARTE V - DISCUSIÓN

1	Papel del receptor cannabinoide CB1 en la neuroinflamación y excitotoxicidad inducidas por estrés	118
1.1	Expresión del receptor CB1 en corteza prefrontal de ratones tras estrés. Mecanismos relacionados con el glutamato	119
1.2	Efectos antiexcitotóxicos/antiinflamatorios provocados por la activación del receptor CB1	120
1.3	Ratones KO para el receptor CB1. Relación con otros estudios	123
2	Papel del receptor cannabinoide CB2 en la neuroinflamación y excitotoxicidad inducidas por estrés	125
2.1	Expresión del receptor CB2 en corteza prefrontal de ratones tras estrés	125
2.2	Efectos antiinflamatorios provocados por la activación del receptor CB2	126
2.3	Ratones KO para el receptor CB2. Relación con otros estudios	131
3	Exposición a estrés repetido y endocannabinoides	132

PARTE VI - CONCLUSIONES

Conclusions 141

Bibliografía 143

Abreviaturas

5-HT	Serotonina
α -MSH	Hormona estimuladora de melanocitos- α
15d-PGJ ₂	15-deoxi-prostaglandina J ₂
AA	Ácido araquidónico
2-AG	2-araquidonil glicerol
ACEA	Araquidonil-2-cloroetilamida
ACh	Acetilcolina
ACPA	Araquidonoilciclopropilamida
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEA	Araquidonoil etanolamida
AMPc	Adenosina-3', 5' monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
AP-1	Proteína activadora 1
ARN/RNA	Ácido ribonucleico
ARN _m	ARN mensajero
ATP	Adenosina tri-fosfato
AVP	Arginina-vasopresina
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CB1	Receptor de cannabinoides 1
CB2	Receptor de cannabinoides 2
CBD	Cannabidiol
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAATs	Transportadores de aminoácidos excitadores
EAAT-2	Transportador de glutamato glial-2
EDTA	Ácido etilenglicolaminotetraacético
ECL	Sistema intensificador de quimioluminiscencia para WB
EIA	Ensayo inmuno enzimático de adsorción
ELISA	Enzimoinmunoensayo
EEM	Error medio muestral

FAAH	Amido hidrolasa de ácidos grasos
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GCs	Glucocorticoides
GR	Receptor de glucocorticoides
GRE	Elementos respondedores de glucocorticoides
HEPES	Ácido 2-(4-(2-Hidroxiethyl)-1-piperacil)-etanesulfónico
HHA	Eje hipotalámico-hipofisario adrenal
IFN- γ	Interferón gamma
I κ B α	Proteína inhibidora de <i>kappa</i> B-alfa
IKK	I κ B kinasa
IL	Interleuquinas
i.p.	Intraperitoneal
LOX	Lipooxigenasas
LPS	Lipopolisacárido
NOS-2	Óxido nítrico sintasa inducible
MAGL	Monoacilglicérol lipasa
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos
MDA	Malonildialdehído
MK-801	Dizocilpina
MR	Receptor de mineralcorticoides
NADA	N-araquidonoil-dopamina
NA	Noradrenalina
NAPE	N-araquidonil-fosfatidiletanolamina
NAPE-PLD	N-araquidonil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NMDA	Receptor-N-metil-D-aspartato de glutamato
NO	Óxido nítrico
NO $_x^-$	Nitritos y nitratos
NOS	Óxido nítrico sintasa
OEA	Oleoiletanolamida
ONOO $^-$	Anión peroxinitrito
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAGE_SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida con docecilsulfato sódico
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PEA	Palmitoiletanolamida
PG	Prostaglandinas
PI3K	Fosfatidil-inositol 3 quinasa
PKC	Proteína quinasa C
PLA $_2$	Fosfolipasa A $_2$
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D

POMC	Proopiomelanocortina
PPAR	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PTSD	Síndrome de estrés post-traumático
PVN	Núcleo paraventricular del hipotálamo
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEC	Sistema cannabinoide endógeno
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
Δ^9-THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
TBS	Solución de Tris tamponada
TBST	Solución de Tris tamponada con Tween 20 al 0,1%
TNF-α	Factor de necrosis tumoral tipo alfa
TRIS	Hidroximetil aminometano
TRPV1	Receptor para vanilloide tipo 1

La presente Tesis Doctoral opta a la Mención de Doctor Europeo, por lo que, cumpliendo la normativa vigente de la Universidad Complutense de Madrid, algunos de los apartados están escritos en inglés (el resumen y las conclusiones).

Summary

Uncontrolled excitotoxicity and neuroinflammation contribute to cell death and damage in neurological and neuropsychiatric diseases, including some that are related to stress exposure (neurodegenerative diseases, depression, post-traumatic stress disorder, and schizophrenia) (McLeod et al., 2001; Madrigal et al., 2006).

Moreover, the relationship between stressful events and the onset, evolution, and resolution of inflammatory-related diseases (cardiovascular, neurological, digestive, or immunological) is well documented (Baum and Posluszny, 1999; Slimmer et al., 2001). Specifically in brain, stress exposure elicits excitotoxicity due to the massive release of the excitatory aminoacid, glutamate, in some brain areas (eg, the prefrontal cortex) (Moghaddam, 1993), inducing the release of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) or interleukin 1 β (Madrigal et al., 2002). Stress also activates the nuclear transcription factor-kappa B (NF- κ B) pathway in a TNF- α dependent mechanism (Bierhaus et al., 2003; Madrigal et al., 2002). NF- κ B activation elicits the expression and activity of proinflammatory enzymatic sources, such as inducible nitric oxide (NO) synthase (NOS-2), and cyclooxygenase- 2 (COX-2), among others (Madrigal et al., 2001a, 2003). The result of this sequence of events is the accumulation of oxidative and nitrosative mediators, which can attack membrane phospholipids and cause cell damage in a process known as lipid peroxidation (McEwen, 1998; Madrigal et al., 2001b). In spite of stress-induced production and accumulation of potentially cytotoxic and/or proinflammatory mediators such as glutamate, NO $^{\cdot-}$, peroxynitrite anion (ONOO $^{\cdot-}$), or prostaglandin E $_2$ (PGE $_2$), various authors have discussed the possibility that some of the many changes caused by stress response effectors are not damaging to the neurons, but in fact predominantly protectivel to their structure and function (rev. in McEwen, 1998). One possible mechanism involved as a possible neuroprotective pathway that has received considerable experimental attention is led by some COX-2-derived lipid mediators, such as prostaglandin 15d-PGJ $_2$ and its peroxisome proliferator-activated nuclear receptor γ (PPAR γ). This COX-derived sub-pathway is activated in the brain in response to stress and other neuroinflammatory stimuli,

constituting a possible endogenous antiinflammatory defense mechanism against excessive excitotoxicity and neuroinflammation (García-Bueno et al., 2008a).

Currently, the endocannabinoid system (ECS) is considered as an endogenous homeostatic system activated by different immune challenges, restoring brain balance at different levels (Mechoulam and Shohami, 2007) in different experimental settings (Galve-Roperh et al., 2008; Wolf et al., 2008; Bambico et al., 2009; Cabral and Griffin-Thomas, 2009). ECS refers to a group of endogenous arachidonate-based lipids (ie, anandamide and 2-arachidonoylglycerol), widely known as ‘endocannabinoids’; their cannabinoid G protein-coupled receptors, namely cannabinoid receptor 1 (CB1) and CB2, and the enzymes fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase that are responsible for their degradation and/or reuptake. Interestingly, several epidemiological studies have identified that cannabinoids affect anxiety and stress responsivity (Ledent et al., 1999) and the presence of the ECS in stress-responsive neural circuits suggests that it may have a critical role in regulating hypothalamic/pituitary/adrenal (HPA) axis activation and the resulting excitotoxic/neuroinflammatory response. Recent evidence suggests that pharmacological enhancement of CB1 protects neurons from acute brain injury, demonstrating a potentially attractive alternative therapeutic strategy against CNS pathologies (Cabral and Griffin-Thomas, 2009). Furthermore, data obtained *in vitro* and from animal models showed the inducible nature of CB2 under neuroinflammatory conditions and suggest that the up-regulation of this receptor is a common pattern of response against different types of chronic human brain neuropathology (Benito et al., 2008; García-Gutierrez et al., 2011).

Taking into account all this background, to elucidate the possible regulatory role of cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2) in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation, both genetic and pharmacological approaches were used alternatively: (1) wild-type (WT), CB1 knockout mice (CB1-KO), CB2 knockout mice (CB2-KO), mice overexpressing CB2 receptor (CB2+) were exposed to immobilization/acoustic stress (2 h/day for 4 days) and (2) to specifically activate CB1 and CB2, the selective CB1 agonist Arachidonyl-20-chloroethylamide (ACEA) (2.5 mg/kg) and the selective CB2 agonist (6aR,10aR)-3-(1,1-Dimethylbutyl)-6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimethyl-6H-dibenzopyran (JWH-133) (2.0 mg/kg) were respectively i.p. administrated daily to some groups of animals.

Stress exposure increased CB1 mRNA and protein expression in the prefrontal cortex of WT mice in a mechanism related to N-methyl-D-aspartate glutamate receptor activation. Daily ACEA pretreatment prevented stress-induced: (1) up-regulation of CB1 mRNA and protein, (2) decrease in glutamate uptake and glutamate astroglial transporter excitatory amino acid transporter 2 expression, (3) increase in consecutive proinflammatory molecules, such as cytokines (tumor necrosis factor- α and MCP-1), nuclear factor kappa B (NF- κ B), and inflammatory enzymatic sources, such as inducible nitric oxide synthase (NOS-2) and cyclooxygenase-2 (COX-2), (4) increase in lipid peroxidation; although having no effect on plasma corticosterone. Interestingly, a possible related mechanism could be the positive ACEA modulation of the anti-inflammatory pathway deoxyprostaglandin/peroxisome proliferator-activated receptor γ (15d-PGJ₂/PPAR γ).

In relation to our findings, stress-induced CB1 up-regulation after stress exposure could represent a compensatory response aimed to control the massive release of glutamate into the synaptic cleft that might produce cellular damage; CB1 receptor activation with ACEA enhances the main glutamate uptake mechanism, by restoring protein expression of the glutamate transporter EAAT-2.

Regarding stress-induced neuroinflammation, we demonstrated that CB1 activation interacted with the proinflammatory response elicited by stress at multiple levels; CB1 activation has been shown to reduce TNF- α , MCP-1, NOS-2 expression and PGE₂ levels. Furthermore, our results show a significant up-regulation of the anti-inflammatory pathway L-PGDS/15d-PGJ₂ after ACEA administration.

Although our results regarding the effects of ACEA on stress-induced increase in plasma corticosterone levels are negative, we and others have showed a dysregulated HPA axis activity in basal and after stress exposure in CB1 KO mice (Barna et al, 2004; Cota, 2008; Aso et al, 2008). In addition, a status of excessive excitotoxicity and neuroinflammation is also presented, increasing their susceptibility to experience damage and even cellular death.

In a complementary set of experiments, we tried to elucidate the possible effect of stress exposure on CB2 expression and the consequences of genetic/pharmacological CB2 activation in the prefrontal cortex in mice.

First, Western Blot and immunohistochemical studies revealed no differences in CB2 protein and mRNA expression after stress exposure.

In addition, daily JWH-133 pretreatment and CB2 receptor over-expression prevented stress-induced (1) increase in consecutive proinflammatory molecules, such as cytokines (TNF- α and MCP-1), NF- κ B, and enzymatic sources, such as NOS-2 and COX-2 and PGE₂ levels, (2) increase in lipid peroxidation and nitric oxide by-products; although having no effect on glutamate uptake and plasma corticosterone. Conversely, CB2 KO animal experiments indicated that a lack of CB2 exacerbated stress-induced neuroinflammatory responses.

Finally we also measured the effects of a protocol of subacute stress on endocannabinoid levels. Stress exposure induced an increase in PEA (palmitoylethanolamide) content, but had no effect on AEA (anandamide) and OEA (oleoylethanolamide) levels. PEA increase could represent a compensatory response aimed at controlling the stress-induced neuroinflammation, possibly through the activation of PPARs receptors. Furthermore, no regulation after stress exposure was observed for NAPE-PLD (N-acylphosphatidylethanolamine phospholipase-D) or FAAH (fatty acid amide hydrolase), two enzymes respectively implicated in the synthesis and degradation of AEA, OEA and PEA. Concerning 2-AG (2-arachidonyl-glycerol), our data show a reduction in the levels of this endocannabinoid in prefrontal cortex in parallel with a decrease of DAGL (diacylglycerol lipase- α), enzyme mostly responsible for its biosynthesis, and an increase of MAGL (monoacylglycerol lipase), which degrades 2-AG. Interestingly, previous studies showed that MAGL hydrolyzes 2-AG to generate a major arachidonate precursor pool for neuroinflammatory prostaglandins including PGE₂, which is increased in our stress model, suggesting that MAGL is a central nervous system metabolic node coupling endocannabinoids to prostaglandin signaling (Nomura et al., 2011).

Overall, these multifaceted neuroprotective effects suggest that compounds able to activate CB1, CB2 or both could be a new therapeutic strategy against neurological/neuropsychiatric pathologies with HPA axis dysregulation and an excitotoxic and/or neuroinflammatory component in their pathophysiology.

PARTE I

INTRODUCCIÓN

Sección 1

El estrés: generalidades

El término “estrés” proviene de la física de materiales pero su uso se ha extendido al ámbito de las ciencias biomédicas donde se utiliza para definir diferentes conceptos y situaciones. El término “estrés” fue definido por primera vez en el ámbito biomédico por el médico de origen húngaro Hans Selye como el “*estado fisiopatológico asociado con los cambios fisiológicos específicos inducidos por diversos estímulos físicos y fisiológicos*” (Selye, 1936).

En la actualidad existen multitud de definiciones, en la mayoría se entiende el estrés como una situación en la que la homeostasis (equilibrio dinámico en el que los componentes del organismo están en constante cambio para mantenerlo en una condición estable y constante dentro de unos márgenes) está comprometida.

Probablemente no exista una definición consensuada de estrés por tratarse de un concepto multidimensional compuesto por varios elementos (Levine y col., 1991): un estímulo inicial o estímulo estresante, el procesamiento del estímulo por el sistema nervioso y la respuesta adaptativa o respuesta a estrés subsecuente.

El estímulo estresante puede definirse como un cambio en el medio detectable por un organismo, que es potencialmente dañino para éste y que provoca respuestas agudas y/o crónicas adaptativas (Ottenweller, 2000). Puede ser de origen físico o psicosocial, real o imaginario.

La respuesta a estrés es un complejo proceso, constituido por múltiples factores fisiológicos, comportamentales, cognitivos y/o emocionales (McEwen y Stellar, 1993). Algunos de los cambios fisiológicos más característicos son: aumento de la frecuencia cardíaca y de la presión sanguínea, redistribución del flujo sanguíneo desde el espacio esplácnico hacia el cerebro y músculos, aumento del tono muscular, de la frecuencia respiratoria y de la motilidad intestinal. Estos cambios preparan al organismo para dar la respuesta estereotipada a estrés que se conoce como “lucha o huida” (Cannon, 1929).

Estos procesos se deben fundamentalmente a la activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) y del sistema catecolaminérgico (Selye, 1936).

1.1 El eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA)

La respuesta a estrés comienza en las áreas corticales sensoriales del cerebro que capta el/los estímulos estresantes. Desde aquí la información alcanza varias regiones del cerebro donde será procesada. Algunas de estas regiones, en especial las cortezas cingulada y prefrontal, pero también la amígdala o el hipocampo, están implicadas en la respuesta a estrés y actúan activando o inhibiendo las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN).

Cuando las neuronas parvocelulares se activan, secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) desde la eminencia media del hipotálamo al sistema venoso portal. La CRH alcanza la región anterior de la hipófisis, o adenohipófisis, (Rock y col., 1984; Dunn y col., 1990), donde regula la transcripción del ARN mensajero (ARNm) de proopiomelanocortina (POMC), macropéptido precursor que será procesado para dar lugar a la hormona adrenocorticotropa (ACTH), a beta-endorfina y a la hormona estimuladora de melanocitos- α (α -MSH) (Lightman y col., 1988). Las neuronas parvocelulares también liberan arginina-vasopresina (AVP) (Whitnall, 1993), que igualmente estimula la liberación de ACTH, sin afectar su síntesis. La ACTH entra en el torrente sanguíneo y actúa sobre las zonas *fasciculata* y *reticularis* de la corteza adrenal para sintetizar y secretar glucocorticoides (GCs) (Figura 1) (Axelrod y col., 1984). En humanos el cortisol es el principal GC y en roedores su equivalente es la corticosterona. Estímulos estresantes psicológicos o físicos provocan un impulso neuronal que activa las células neurosecretoras del PVN y provoca la liberación de CRF, que en la hipófisis estimula la liberación de ACTH y la producción de GC en la corteza adrenal. Los GCs tienen varios efectos fisiológicos a corto o largo plazo actuando a nivel de varias áreas cerebrales como el PVN, la corteza prefrontal y el hipocampo (Kloet y col. 2005; Groeneweg y col., 2011) y provocan un *feedback* negativo sobre el eje HHA de forma que cuando los niveles de GCs son elevados inhiben la secreción de CRH y ACTH tanto en el hipotálamo (Evanson y col., 2010; Jones y col., 1977) como en la hipófisis (Russell y col., 2010; Cole y col., 2000) (Figura 1).

El feedback inhibitorio mediado por los GCs ocurre también a nivel del hipocampo (Sapolsky y col., 1984; Furay y col., 2008), núcleo paraventricular del tálamo (Jaferi y col., 2003; Jaferi y Bhatnagar, 2006), y corteza prefrontal (Hill y col., 2011; Radley y Sawchenko, 2011). En las neuronas del PVN los GCs activan los receptores para glucocorticoides tipo II o GR e inducen la síntesis de endocannabinoides y su liberación retroactiva (Di y col. 2003; Tasker y col. 2006; Myers y col., 2012). Los endocannabinoides activan los receptores cannabinoides pre-sinápticos de las terminaciones glutamatergicas e inhiben la liberación de glutamato. La activación glutamatergica de la neurona post-sináptica se reduce, por consecuencia disminuye la liberación de CRH y la activación del eje HHA. (Di y col., 2003; Tasker y col., 2006; Riebe y Wotjak, 2011; Hill y col., 2010b).

Existen dos tipos de receptores para corticoides: receptor de mineralocorticoides (MR) o

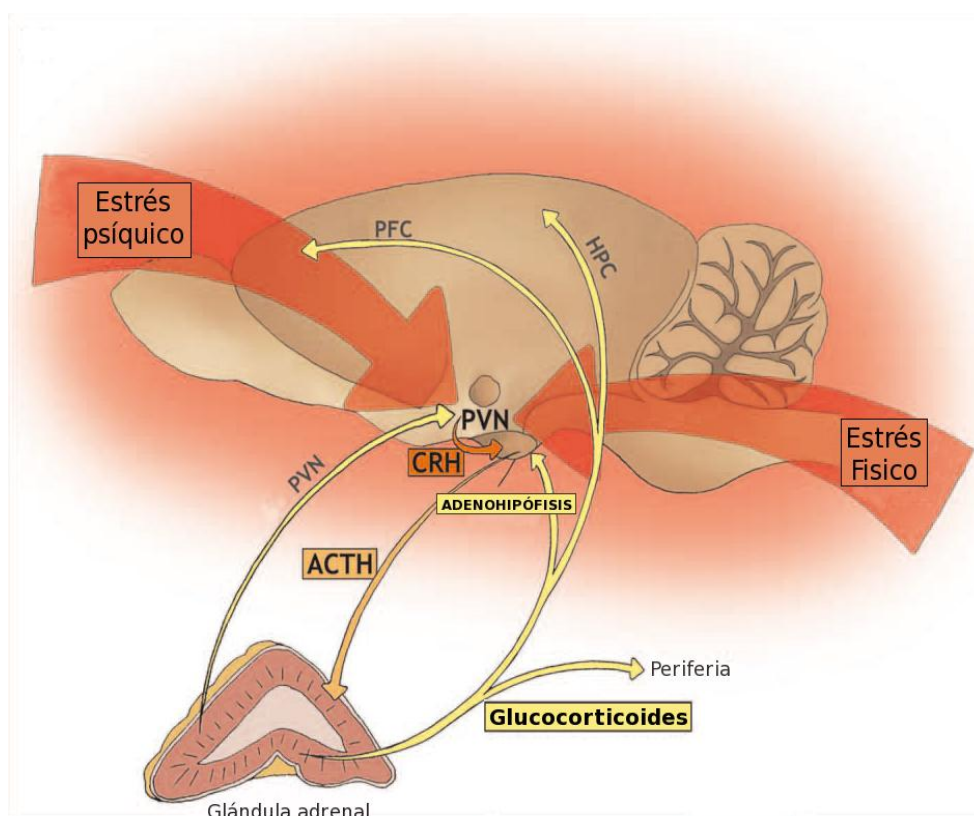


Figura 1 - El eje HHA y su mecanismo de feedback glucocorticoide-dependiente mediado por endocannabinoides en el PVN. (Adaptación de Riebe y Wotjak, 2011). PFC= Corteza prefrontal; PVN= Núcleo paraventricular; HPC= Hipocampo; CRH: hormona liberadora de corticotropina.

de tipo I y de glucocorticoides (GR) o de tipo II (de Kloet y col., 1999; de Kloet y col., 2005). Los receptores MR son de alta afinidad y se saturan a niveles basales de corticosteroides, se considera que se ocupan de la regulación de las fluctuaciones circadianas de estas hormonas. Los receptores GR tienen menos afinidad pero son muy reactivos a los cambios de concentración de GCs (Reul y de Kloet, 1985; de Kloet y col., 1998).

Los MR regulan la actividad del eje de forma tónica, mientras que en situaciones de estrés los GR parecen tener un papel más importante. En el sistema nervioso central (SNC), los receptores GR se expresan en mayor medida que los MR, sobre todo en ciertas regiones como la pituitaria, hipocampo, septum, núcleo paraventricular del hipotálamo o núcleo supraóptico. La densidad de receptores para GCs en el cerebro varía en relación al ciclo circadiano, edad, experiencias anteriores y al estrés agudo o crónico sufrido por el individuo durante las distintas etapas de su vida (Spencer y col., 1990; van Eekelen y col., 1992; Meyer y col., 2001).

1.2 Sistema catecolaminérgico

El estrés estimula el Sistema Nervioso Simpático (SNS) (rev en Valentino y col., 1993). Esta activación empieza cuando el hipotálamo activa las vías autónomas descendentes que secretan Noradrenalina (NA) y las fibras nerviosas que inervan el nervio esplénico, activando las células cromafines de la médula adrenal para que produzcan catecolaminas (Reul y col., 1998).

Una vez llegados a la corteza sensitiva, los estímulos estresantes se propagan hasta el sistema límbico, donde se produce una liberación de mediadores neuroquímicos entre los que destacan NA, además de la serotonina (5-HT) y la acetilcolina (ACh) (Rock y col., 1984). Por otro lado, la CRH liberada por el PVN y la derivada de las neuronas presentes en el núcleo de la amígdala, activadas también por los estímulos estresantes, estimula las neuronas que forman el locus coeruleus del tallo cerebral, que liberan NA de sus terminales repartidos por todo el SNC (Reul y col., 1998).

1.3 Sistema serotoninérgico

El sistema serotoninérgico ha sido implicado directamente en los efectos del estrés en el hipocampo. El estrés eleva los niveles de serotonina en esta estructura (Joseph y Kennett, 1983) y la administración intracerebro-ventricular de CRH influye en la liberación de 5-HT en ratas previamente estimuladas (Linthhorst y col., 1997). Además, la infusión directa de CRH en el núcleo del rafe reduce la actividad serotoninérgica cerebral (Price y col., 1998). 5-HT es uno de los neurotransmisores más relacionados en los últimos años con la patofisiología de enfermedades relacionadas con el estrés como el PTSD (Síndrome de estrés post-traumático), depresión, ansiedad y trastornos compulsivos (Tollefson y col., 1995; Den Boer, 1998) ya que existe una clara interacción y correulación entre el eje HHA y el sistema serotoninérgico: los dos sistemas poseen conexiones neuroanatómicas a nivel del PVN (Rev. en Fuller, 1981) y del hipocampo por proyecciones nerviosas serotoninérgicas procedentes del núcleo del rafe. Existe una interacción de estos sistemas también a nivel de sus receptores: ciertos protocolos de estrés crónico impredecible producen una regulación a la baja del receptor de serotonina más abundante en el hipocampo, 5HT-1A (Lopez y col., 1998) y la administración de ACTH o la acción de GCs generados tras estrés social crónico reducen la depresión del receptor 5HT-2A en la corteza cerebral de ratas (McKittrick y col., 1995; Kuroda y col., 1994).

1.4 Sistema gabérgico

El neurotransmisor GABA (ácido gamma-aminobutírico) interfiere en la respuesta general a estrés ya que es capaz de inhibir la liberación de ACTH y corticosterona *in vivo* (Makara y Stark, 1974; Jones y col., 1984) y de reducir la secreción de CRH a nivel hipotalámico (Calogero y col., 1988; Hillhouse y Milton., 1989), lo que sugiere que GABA interactúa directamente con las neuronas del PVN. Ciertos estudios implican al receptor GABA_A en la atrofia dendrítica originada por estrés en la remodelación del hipocampo (Magariños y col., 1999). El estrés por su parte también actúa sobre el sistema gabérgico ya que se ha podido demostrar que el tratamiento crónico con corticosterona produce cambios en los niveles de ARN mensajero de la subunidad GABA_A modificando su función tónica inhibitoria en subzonas discretas del hipocampo (Orchinik y col., 2001). La activación de los

receptores GABA_A a nivel del PVN mediante muscimol antes y durante la exposición a estrés suprime la respuesta HHA (Kovács y col., 2004; Wamstecker y col., 2010).

1.5 Sistema opioide

Los péptidos opioides endógenos se encuentran entre los neurotransmisores liberados por un organismo cuando detecta una situación estresante (principalmente encefalina y endorfinas). La encefalina, a través de la unión sobre sus receptores, realiza acciones sobre los ejes HHA y simpatoadrenal, principales encargados de mantener la homeostasis durante la exposición a agentes estresantes de diverso tipo (Howlett y Rees, 1986). En particular, encefalina modifica la síntesis y liberación de CRH en el hipotálamo (Borsook y Hyman, 1995). Por otro lado, numerosas evidencias farmacológicas indican la regulación de encefalina sobre el sistema simpático y los sistemas neuronales que controlan aspectos cardiovasculares y respiratorios (Holaday, 1983; McCubbin, 1993). Se han publicado varios estudios que describen altos niveles de ansiedad en animales *knock out* para los opioides endógenos encefalinas o péptidos derivados de la pre-proencefalina (Konig y col., 1996). El fenómeno de analgesia que presentan los animales expuestos a estrés por inmovilización está mediado por un efecto inhibitorio sobre los receptores opioides (Maier, 1986), de este modo se ha demostrado que el estrés reduce la afinidad por ligando del receptor μ -opioide en el cerebro medio de la rata (Stuckey y col., 1989).

Sección 2

Mediadores del estrés

Existen numerosos mediadores intra o intercelulares que se ponen en marcha tras exposición a estrés tanto en el SNC como en la periferia.

2.1 Glucocorticoides

Los glucocorticoides son hormonas de bajo peso molecular, de naturaleza lipídica (derivados estructurales del colesterol) que poseen numerosas funciones en relación con el metabolismo y con los sistemas cardiovascular, inmunológico y nervioso (Munck y col., 1984; Holsboer y col., 1994).

Se pueden dividir en dos grandes grupos: mineralcorticoides (aldosterona) y glucocorticoides (corticosterona en roedores o su equivalente en humanos, cortisol). Los mineralcorticoides están implicados en la apetencia e ingesta de sal y en la regulación osmótica. Los glucocorticoides controlan el metabolismo energético de la glucosa y los triglicéridos y la función de los sistemas cardiovascular (Michelson y col., 1994a), inmune e inflamatorio (Pariante y col., 2001). En el SNC se han identificado como reguladores de diferentes procesos como la neurogénesis, neuroinflamación, neurodegeneración, memoria, aprendizaje y mecanismos de adaptación (McEwen, 1999). Además son responsables del mecanismo retroinhibitorio del eje HHA activado tras la exposición a un agente estresante actuando sobre sus receptores presentes en el hipotálamo (Evanson y col., 2010; Jones y col., 1977) hipófisis (Russell y col., 2010; Cole y col., 2000), estructuras límbicas tales como el hipocampo (Sapolsky y col., 1984; Jacobson y Sapolsky, 1991; Furay y col., 2008), PVN (Jaferi y col., 2003; Jaferi y Bhatnagar, 2006) y la corteza prefrontal (Hill y col., 2011; Radley y Sawchenko, 2011).

Los GCs son conocidos por sus acciones antiinflamatorias a nivel periférico y recientemente se ha visto que parte de estas acciones antiinflamatorias serían en parte provocadas por una interacción entre GR y MAPK (proteína kinasa activadas por mitógenos)

(Kharwanlang y Sharma 2011). Si bien se han descrito acciones rápidas no genómicas de los GCs mediadas por receptores de membrana, se acepta que los efectos de los GCs dependen de la capacidad de activar su receptor intracelular y modificar la expresión génica (Barnes y col., 1998; Refojo y col., 2003). Hay diversos mecanismos de acción descritos para los GCs, pero todos ellos pueden agruparse en dos esenciales:

a) Actividad transcripcional mediada por unión directa al ADN: una vez en el núcleo, los GR activados dimerizan y se unen a secuencias consenso respondedoras en el ADN llamadas elementos respondedores a glucocorticoides (GRE). Así, por ejemplo, parte de las acciones inmuno-supresoras de los GC pueden explicarse por la inducción de la proteína inhibidora del factor nuclear-kappaB (I κ B), que bloquea su traslocación al núcleo e impide de ese modo la activación de genes inducidos por este factor, muchos de los cuales corresponden a citoquinas y otras proteínas mediadoras de inflamación. En algunos casos los GC se pegan a sitios de unión en el ADN, pero en lugar de inducir, reprimen la transcripción. Estos sitios se conocen como GRE negativos y están descritos en algunos genes como el de la POMC (Drouin y col., 1998) o el promotor de Fas ligando (FasL) (Novac y col., 2006).

b) Interacción proteína-proteína: Plantea la interacción física entre el GR activado y otros factores de transcripción como NF- κ B (Scheinman y col. 1995; Caldenhoven y col., 1995), T-bet (*T-box* expresado en células T) el factor de transcripción específico para la diferenciación hacia el linaje Th1 (Lineraman y col., 2007) o la proteína activadora 1 (AP-1). Todos estos mecanismos de represión transcripcional vía interacción proteína-proteína se denominan en conjunto *trans-represión*. Muchas proteínas virales, lipopolisacáridos bacterianos, quimioquinas y citoquinas proinflamatorias ejercen sus efectos a través de la activación de NF- κ B y AP-1. Esto explica a nivel molecular por qué además de su acción inmunosupresora los GCs son potentes antiinflamatorios. La transrepresión es el mecanismo fundamental por el cual los GCs ejercen su acción antiinflamatoria e inmunosupresora. Si bien los mecanismos de transactivación pueden ejercer efectos inmunosupresores al verse activada la transcripción de un gen inhibitorio como el de I κ B, los GCs utilizan este mecanismo de acción para muchas otras acciones (Lieberman y col., 2007), y ello explica a nivel molecular los graves efectos adversos metabólicos y endocrinos producidos por la administración prolongada de corticosteroides.

Sin embargo tras estrés, a pesar de los niveles elevados de GCs, se puede describir un estado de inflamación en SNC; el aumento o la disminución de la inflamación del SNC depende de los niveles de GCs, de la duración de la exposición a GCs y del tipo de receptor activado, puesto que estos esteroides representan un grupo heterogéneo de compuestos (Sorrells y col., 2007). Los glucocorticoides tienen una gran variedad de efectos en el cerebro. En particular, las células del hipocampo expresan niveles elevados de GR y MR y son unas de las primeras dianas de las acciones de los GCs (Jankord y Herman., 2008). Estas acciones incluyen las funciones fisiológicas mediadas por la ocupación de los MR y el pequeño incremento en la ocupación de GR observado en la fase temprana de la respuesta a estrés (de Kloet y col., 2000). Estos efectos basales y permisivos incluyen la prevención de la muerte neuronal en el giro dentado, el aumento de la plasticidad sináptica y la facilitación del aprendizaje mediado por el hipocampo. Sin embargo, las acciones de los glucocorticoides en el hipocampo siguen un patrón de U invertida, de forma que una exposición prolongada a niveles elevados de GCs tiene efectos deletéreos mediados por la alta ocupación de los GR (Bremner 1999). La hipótesis de la cascada de glucocorticoides propone que el daño hipocampal, que resulta en la regulación a la baja de los GR en las neuronas del hipocampo, conlleva un fallo en el control del feedback negativo del eje HHA. La consecuencia de tal fallo sería la elevación a largo plazo de los niveles de corticosteroides (Salposky y col., 1986) que resulta perjudicial para estas neuronas, produciendo reducción de densidad de espinas, atrofia de las ramificaciones dendríticas, inhibición de la neurogénesis, alteración en la plasticidad neuronal y disfunción cognitiva (McEwen y col., 2001). Las consecuencias adversas de la elevación prolongada de GCs son particularmente dramáticas cuando coinciden con un daño neuronal, como en isquemia, epilepsia, hipoglucemia y deposición del péptido β -amiloide (Salposky y col., 1985; Tombaugh y col., 1992a; Tombaugh y col., 1992b; Goodman y col., 1996).

Este aumento de los GCs sobre la sensibilidad y respuesta neuronal frente a distintos estímulos nocivos también aparece, aunque en menor medida, en otras regiones cerebrales aparte del hipocampo como el estriado, corteza y los núcleos basales (Abraham y col., 1997; Iyer y col., 1998).

Los mecanismos por los que los GCs ejercen sus efectos nocivos sobre el SNC son muy variados; uno de los más conocidos es la inhibición de la utilización de glucosa por las células

cerebrales. Los mecanismos propuestos son dependientes de receptor y se basan en una translocación de los transportadores de glucosa GLUT desde la membrana celular a sitios intracelulares (Horner y col., 1987) y en la inhibición de la transcripción del gen del transportador (Garvey y col., 1989). Otros de los mecanismos de los efectos nocivos de los GCs en el SNC que ha recibido mayor atención es el aumento de la susceptibilidad al proceso de muerte neuronal conocido como excitotoxicidad por altas concentraciones de aminoácidos excitadores (glutamato) ya que los GCs aumentan la concentración de glutamato en la hendidura sináptica (Moghaddam y col., 1994; Lowy y col., 1994).

2.2 Glutamato

En la respuesta a estrés, uno de los primeros procesos que tienen lugar es la liberación al espacio extracelular de altas concentraciones de los aminoácidos excitadores glutamato y aspartato en ciertas estructuras cerebrales como la corteza prefrontal o el hipocampo (Moghaddam, 1993). El glutamato, a través de sus receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) provoca la entrada masiva de calcio en las células lo que desencadena un proceso excitotóxico que puede producir daño y muerte celular (Lipton, 1999; Lee y col., 2002). El proceso de transmisión glutamatérgica está mediado por los GCs producidos tras el estrés, tal como indica el hecho de que los GCs aumentan la concentración de glutamato en la hendidura sináptica (Moghaddam y col., 1994; Lowy y col., 1994) además de potenciar selectivamente la acumulación de glutamato en respuesta a daño excitotóxico tanto en hipocampo *in vitro* (Chou y col., 1994) como *in vivo* (Stein-Behrens y col., 1994). La excitotoxicidad inducida por los GCs se debe a una inhibición de la recaptación o “aclaración sináptica” realizada por los transportadores de glutamato de la glía (EAAT-2) (Chou y col., 1994; Yang y col., 2009). Los mecanismos propuestos para explicar la acción inhibitoria de los GCs sobre los transportadores de aminoácidos excitadores (EAATs), están basados en la necesidad de ATP de los transportadores para su correcto funcionamiento. Los GCs, al interferir en la captación y utilización de la glucosa a nivel cerebral (Horner y col., 1987; Horner y col., 1990) comprometerán el mantenimiento de los niveles normales de ATP, lo que se manifestará en una disminución en la recaptación de glutamato por parte de los EAATs, llegando incluso a producirse una reversión en su funcionamiento normal, liberando Ca^{2+} al espacio extracelular (Lawrence y Salposky 1994; Rossi y col., 2000).

Todo ello contribuirá a un aumento de los niveles extracelulares de glutamato y por tanto a una mayor muerte neuronal inducida por excitotoxicidad. La expresión disminuida del transportador glial EAAT2 contribuye a la patogénesis de trastornos afectivos (Zink y col., 2009) y una desregulación de la neurotransmisión glutamatérgica está involucrada en la patogénesis del estrés y depresión y en los cambios morfológicos y funcionales asociados a estas patologías, como se expone en mayor detalle en el apartado 3.1.2 de esta Tesis doctoral. (Grahm y col., 2000 Petty y col., 1985; Zink y col., 2010; Sanacora y col. 2012; Graybeal y col., 2012).

2.3 Mediadores inflamatorios

En un principio se pensó que el estrés produce un estado de inmunodepresión relacionada con un aumento de la probabilidad de sufrir una patología infecciosa bacteriana o viral y que el eje HHA se activa como mecanismo de freno frente a una activación excesiva del sistema inmune, donde los GCs liberados son los agentes antiinflamatorios más importantes (Rhen y col., 2005). En los últimos años algunos autores se han cuestionado la universalidad de este papel antiinflamatorio, y se han descubierto situaciones en las que estos mediadores desencadenan un proceso proinflamatorio. Hoy se sabe que distintos que tipos de estrés pueden producir un estado de inmunoestimulación (Raison y col., 2006).

Gran parte de los efectos estimuladores de la inmunidad se deben a la acción de las catecolaminas, aunque los GCs también participan en esta activación. La cuestión de cómo los GCs pueden ser a la vez anti y proinflamatorios es muy compleja y ha llevado a mucha especulación (Salposky y McEwen., 1986).

Parece ser que su papel va a depender de la concentración (tipo de receptor predominantemente activado), lugar de acción (distinto en sistema nervioso que en periferia) y duración del estímulo, entre otros. La exposición a estrés puede inducir una respuesta de fase aguda muy similar en la naturaleza de sus componentes a la respuesta inflamatoria generada en un organismo en respuesta a infección o traumatismo agudo: activación glial, síntesis y liberación de citocinas, radicales libres, prostaglandinas y factores nucleares (Elenkov y col., 2002; Lucas y col., 2006).

Se ha demostrado que tras exposición a estrés por inmovilización, cuando los GCs endógenos están elevados, se produce una liberación y acumulación de mediadores típicamente proinflamatorios, como el óxido nítrico (NO), prostaglandinas proinflamatorias (PGE₂), citocinas como la interleucina 1beta (IL-1β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y activación de NF-κB (Madrigal y col., 2003). A nivel cerebral estos mediadores conducen a un estado de neuroinflamación en el cerebro que podría contribuir al daño celular observado en las neuropatologías asociadas a la exposición a estrés (Rev. en Maes., 2011). La exposición a distintos tipos de estrés altera el balance de citocinas pro y antiinflamatorias. Muchas evidencias indican que los GCs y las catecolaminas, principales mediadores del estrés, inhiben la producción de citocinas proinflamatorias como TNF-α, IL-1β, interleucina-6 (IL-6) o interferón gamma (IFNγ) (Dunn y col., 1999), mientras que estimulan la producción de citocinas antiinflamatorias como la interleucina-10 (IL-10) o interleucina-4 (IL-4) (Raison y col., 2003). Estos efectos opuestos pueden interpretarse como que los efectos de las hormonas del estrés aisladamente parecen ser distintos que cuando actúan conjuntamente en la respuesta general a estrés. Otro factor importante que interviene en la respuesta proinflamatoria a estrés es el factor de transcripción NF-κB. En el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis, se demostró cómo el estrés por inmovilización activa al NF-κB en el cerebro de rata (Madrigal y col., 2002). En situación basal el NF-κB se encuentra en citosol unido a proteínas inhibidoras IκBs, de manera que se mantiene inactivo. La activación consiste en la fosforilación de IκB en citosol por las kinasas de IκB (IKK). El IκB se degrada y el NF-κB queda libre y se transloca al núcleo donde se une a regiones específicas de ADN y altera la transcripción de ciertos genes implicados en el daño oxidativo/proinflamatorio como el enzima óxido nítrico sintasa inducible (NOS-2) o la isoforma 2 de la ciclooxigenasa (COX-2) (Baldwin, 1996). El enzima NOS-2 está implicado en fenómenos de citotoxicidad debido a las elevadas concentraciones de NO que libera su actividad (rev. en Moncada y col., 1991). El NO es una molécula muy reactiva capaz de reaccionar con otras especies oxidativas como el anión superóxido y formar peroxinitrito (ONOO⁻), uno de los principales agentes de la generación de estrés oxidativo pues altera la composición y función de las membranas lipídicas, proteínas y ADN (rev. en Szabo, 2003).

Por su parte, el enzima COX-2 es responsable de la síntesis de endoperóxidos que se transforman en las diferentes prostaglandinas (PG), por la acción de prostaglandin-sintasas específicas de tejido. La COX-2 es capaz de producir niveles de PG proinflamatorias como la PGE_2 , que puede inducir una liberación masiva de glutamato, generando un proceso excitotóxico potencialmente deletéreo para la célula (Takadera y col., 2002). Sin embargo, no todos los mecanismos que se desencadenan en el cerebro tras la exposición a estrés son de naturaleza proinflamatoria. Uno de estos mecanismos emergentes es el de las prostaglandinas antiinflamatorias derivadas de la activación de COX, en especial de la 15-deoxi-prostaglandina J_2 o 15d-PGJ_2 , principal ligando endógeno de los receptores nucleares activados por los proliferadores de peroxisomas γ ($\text{PPAR}\gamma$). Estos receptores se han implicado directamente en la regulación de la respuesta inflamatoria en múltiples modelos animales de neuropatologías (Feinstein, 2003; Shie y col., 2009; Sodhi y col., 2011). Los mecanismos proinflamatorios y antiinflamatorios que desencadena la exposición a estrés quedan esquematizados en la Figura 2 (García-Bueno y col., 2008).

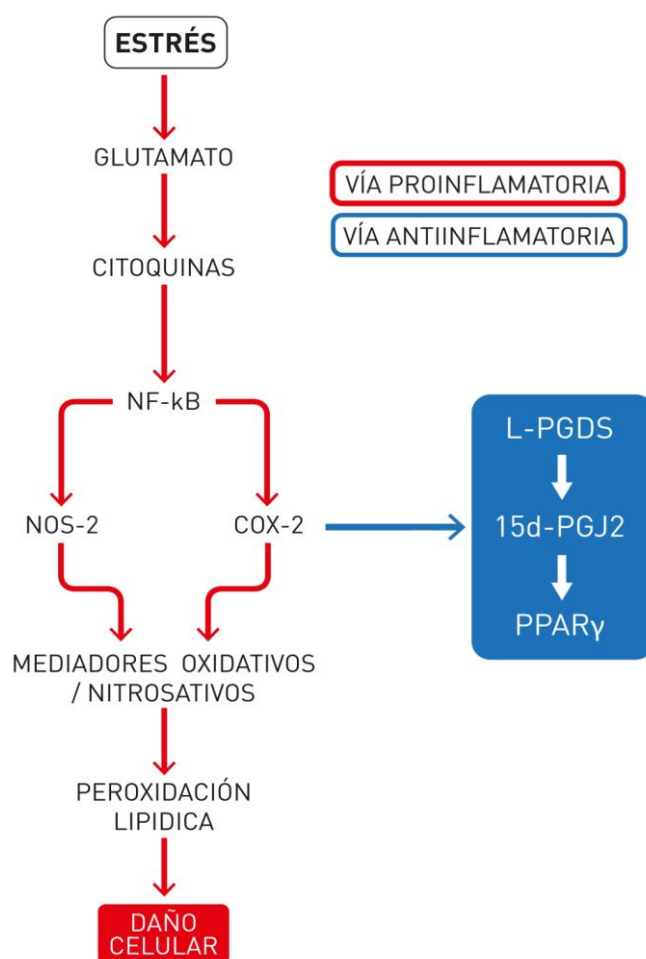


Figura 2. - Esquema-resumen de las vías proinflamatoria y antiinflamatoria activadas por el estrés en el cerebro (Adaptación de García-Bueno y col., 2008).

Sección 3

Estrés y patologías

3.1 Estrés y neuropatologías

Cuando el estrés es crónico, intenso e incontrolable está asociado con el inicio, desarrollo y resolución de múltiples enfermedades que afectan a la casi totalidad de los sistemas orgánicos (rev. en Baum y Posluzsny, 1999; Myers y col., 2012).

En lo que respecta al sistema nervioso, el estrés está íntimamente relacionado con numerosas enfermedades neurodegenerativas o de base inflamatoria (enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, etc.) y patologías psiquiátricas como la ansiedad, la esquizofrenia o la depresión.

3.1.1 Estrés y patologías Neurológicas/Neurodegenerativas

Se ha podido observar un nexo entre la intensidad de la respuesta general a estrés con el aumento del índice de neurodegeneración edad-dependiente y con una reducción de la esperanza de vida (Gilad y Gilad, 1995). Los efectos del estrés en el SNC se concentran principalmente sobre el hipocampo y como consecuencia en las funciones que éste lleva a cabo, como el control de la liberación de CRH y GCs y la consolidación de la memoria, aprendizaje y su regulación sobre la amígdala (Mizoguchi y col., 1992). Diversos estudios han demostrado una inhibición del proceso de neurogénesis en adultos en el giro dentado del hipocampo de roedores tras distintos protocolos de estrés (Gould y col. 1997, Czeh y col., 2001; Heine y col., 2004; Rothman y Mattson, 2010). De hecho, la administración de corticosterona en roedores tiene un efecto inhibitorio casi inmediato (menos de tres horas) en la tasa de generación de células en la capa granular del giro dentado (Cameron y col., 1998), lo que parece indicar que incluso las fluctuaciones en los glucocorticoides por el estrés diario podrían afectar a la tasa de neurogénesis (Karten y col., 2005). Por último, también se han relacionado estos efectos del estrés con un aumento en la predisposición e incidencia de depresión (Sheline y col., 1996, Ng y col., 2008; Moretti y col., 2011).

El hipercortisolismo y la respuesta inflamatoria excesiva consecuentes a estrés contribuyen a la apoptosis y muerte neuronal (Zhu y col., 2010; Woodman y Lockette, 2009). El estrés incrementa la respuesta inflamatoria (Maes y col., 2002) y reduce la neurogénesis (Rothman y Mattson, 2010). En modelos animales de depresión inducida por estrés han sido detectados niveles disminuidos de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Angelucci y col., 2005), aumento de la producción de radicales libres del oxígeno y estos mismos cambios han sido observados en pacientes deprimidos (Sarandol y col., 2007; Forlenza y Miller, 2006; Maes y col., 2007). El estrés oxidativo afecta la expresión génica y la proteólisis que contribuyen a la neurodegeneración (Halliwell, 2006; Mancuso y col., 2006; Bazan y col., 2005; Potashkin y Meredith, 2006).

El estrés ha sido implicado en la desencadenación y la progresión de la enfermedad de Alzheimer (Sotiropoulos y col., 2008). Se ha demostrado que el estrés crónico causa déficits de memoria al actuar sobre la estructura y la función del hipocampo, efecto que puede exacerbar la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer que cursa con deterioro cognitivo y mental. Por otro lado el componente inflamatorio que posee la respuesta general a estrés contribuye a los síntomas de la enfermedad (Hull y col., 1996; Esch y col., 2002a). La hipersecreción de GCs se correlaciona al empeoramiento cognitivo y a la extensión de la atrofia neuronal de los pacientes afectados por la enfermedad de Alzheimer. En un modelo animal de esta enfermedad, los GCs exógenos inducen la hiperfosforilación de los epitotos TAU y la acumulación citoplasmática de esta proteína, agravando la evolución de la enfermedad (Sotiropoulos y col., 2011). Otro estudio evidencia también que el estrés aumenta el daño oxidativo en esta enfermedad (Kumari y col., 2007).

El estrés y sus hormonas pueden contribuir a la desencadenación de la enfermedad de Parkinson, aumentando la vulnerabilidad de las neuronas nigroestriales a subsiguientes estímulos tóxicos (inyecciones intracerebrales de 6-hidroxidopamina) (Smith y col., 2002).

La respuesta inflamatoria crónica es uno de los mecanismos patogénéticos que conducen a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas. En la enfermedad de Parkinson estudios post-mortem han evidenciado la presencia de microglía reactiva y una elevada expresión de moléculas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , NOS-2 y COX-2 en las regiones afectadas (Ouchi y col., 2005).

Numerosos estudios han evidenciado que la respuesta glucocorticoide está involucrada en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson; niveles crónicos elevados de GCs exacerban los déficits motores de ratones tratados con 6-hidroxi-DA (Smith y col., 2008) y los receptores GR a nivel de la microglía tienen un papel fundamental en la regulación de la neurodegeneración dopaminérgica (Ros-Bernal y col., 2011). Estas observaciones experimentales se correlacionan con los datos clínicos que evidencian que el estrés puede desencadenar o empeorar las síntomas motores en pacientes afectados por esta enfermedad (Smith y col., 2002).

La respuesta general a estrés ha sido también relacionada con la esclerosis múltiple y la encefalitis autoinmune/alérgica experimental al compartir los mismos mecanismos intrínsecos, como es la activación dependiente de NO de diversas citocinas proinflamatorias como IL-2, IL-6, TNF- α o IFN- γ (Michelson y col., 1994). Se ha podido demostrar que una respuesta a estrés inadecuada dentro del SNC puede constituir un evento crucial en el inicio del desarrollo de la esclerosis múltiple debido fundamentalmente al papel inmunoregulador de los GCs liberados por el estrés (van Noort, 1996).

3.1.2 Estrés y patologías Neuropsiquiátricas

Se ha documentado una estrecha relación del estrés con el inicio y evolución de diversas patologías mentales, como la ansiedad, la depresión y esquizofrenia (Czeh y col., 2008). El estrés forma parte de los mecanismos relacionados con la ansiedad mediante la sobreactivación simpática que se produce (Rachal Pugh y col., 2001). En algunos individuos se puede originar una respuesta frente a estrés defectuosa (Chrousos y Gold., 1992; Yeuda 2007; Rev. en Langeland, 2008), que se adquiere tras experiencias estresantes prenatales o postnatales, lo que conlleva a un aumento de la susceptibilidad frente a alteraciones mentales posteriores como el síndrome de estrés post-traumático (Rev. en Vasterling, 2011), en el que se presenta una exagerada respuesta amigdalal, una deficiente función de la corteza prefrontal, una disminuida activación del hipocampo y una reducción de su volumen (Eckart y col., 2011). Los mecanismos moleculares que se han propuesto son una sobreproducción de CRH (Rachal Pugh y col., 2001), hipercortisolemia (Burt y col., 1995), degeneración catecolaminérgica central (Kitamaya y col., 1997), alteraciones en el sistema serotoninérgico (McCarty y Gold., 1996), cambios en la expresión y liberación de melatonina

(Lewy y col., 1998) y acumulación de NO (rev. En Esch y col., 2002b). Niveles aumentados de cortisol han sido detectados en cerebro de pacientes con esquizofrenia; un estudio ha evidenciado una asociación negativa entre las hormonas del estrés y los niveles de BDNF, que juega un papel importante en la patofisiología de la esquizofrenia (Issa y col., 2010), así como las alteraciones en la función de la corteza prefrontal tras estrés crónico contribuyen a la sintomatología esquizofrénica (Arnsten y col., 2009).

3.1.3 Estrés y depresión

Estímulos estresantes externos que ocurren a lo largo de la vida de un individuo o internos como condiciones inflamatorias tras infecciones bacterianas o autoinmunes han sido implicados en la etiología de la depresión (Maes y col., 2009; Rev. en Anisman, 2009; Miller y col., 2009). El estrés afecta el sistema inmune, regulando la activación de citoquinas, moléculas de adhesión celular y respuestas de las células T (Whewey y col., 2007) y disminuye la capacidad del organismo de enfrentarse a infecciones (Buynitsky, 2009) y ralentiza la velocidad de las células de migración hacia el foco infeccioso (Echeverry y col., 2004). La depresión se acompaña de la activación de vías inflamatorias inmunes y de estrés oxidativo/nitrosativo inducidas por estrés (Rev. en Maes, 2010; Gardner y Boles, 2010). En los años sesenta se demostró que los pacientes diagnosticados de depresión mayor presentan hipersecreción de cortisol (Gibbons y col., 1962). Desde entonces diversos estudios han corroborado que las hormonas del eje HHA se encuentran alteradas en los pacientes que presentan esta patología (Gold y col., 1986). Algunos estudios demuestran que esta hipercortisolemia en pacientes con depresión mayor puede deberse a una hipersecreción de CRH (Nemeroff y col., 1984) y ACTH (Kalin y col., 1982; Pfohl y col., 1985).

Numerosos estudios han demostrado que el estrés induce cambios importantes en la estructura y morfología cerebrales en animales de experimentación. En función de su intensidad puede provocar remodelado dendrítico, reducción de espinas sinápticas, pérdida glial y neuronal y reducción de volumen de ciertas estructuras cerebrales como el hipocampo (Gorman y Docherty, 2010; Holmes y Wellman, 2009; McEwen, 2005) y también en otras estructuras como la corteza prefrontal (Musazzi y col., 2011). Estos cambios son parecidos a aquellos observados en cerebro de pacientes deprimidos (Pittenger y Duman, 2008; Shansky y Morrison, 2009).

El estrés puede ser la causa principal o un factor etiológico muy importante en los diversos tipos de depresión (Vaidya, 2000), incluida la depresión mayor (Meyer y col., 2001). En general, la respuesta a estrés está diseñada para ser de duración limitada y los cambios en la actividad hormonal y en la neurotransmisión son rápidamente restaurados a los niveles pre-estrés en algunos minutos o horas. Cuando el estrés es crónico, se puede instaurar la activación crónica del eje HHA y del sistema nervioso simpático generando ansiedad y síntomas depresivos (Charmandari y col., 2003; Weinstock, 2005) y alteraciones de la competencia inmune (Coe y col., 2002). Por otro lado, los tratamientos antidepresivos son capaces de restaurar el feedback negativo de los GCs sobre el eje HHA (rev. en Pariante, 2006; Surget y col., 2011).

Estudios preclínicos han evidenciado que la exposición a estrés crónico causa a nivel de la corteza prefrontal y de la amígdala un remodelado neuronal que podría estar relacionado con los cambios estructurales y funcionales asociados a depresión y trastornos de ansiedad (Hill y col., 2011). La exposición a estrés de diferente intensidad y duración provoca una simplificación y una retracción del árbol dendrítico apical en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal medial (Shansky y col. 2009; Bloss y col. 2010). En este proceso la neuroinflamación inducida por estrés ha sido relacionada con la apoptosis y con una reducción en la tasa de neurogénesis asociadas al comienzo de la depresión (Kubera y col., 2011).

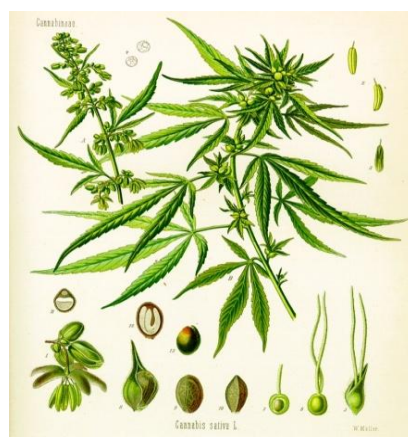
Sección 4

Bioquímica del sistema cannabinoide

Los cannabinoides constituyen un conjunto de compuestos psicoactivos presentes en la planta *Cannabis Sativa*, tanto en sus hojas y brotes florecidos como en una resina secretada por ella. El uso de preparaciones a partir de esta planta ha sido muy extendido a lo largo de la historia, ya sea con fines terapéuticos o formando parte de rituales de carácter religioso o social. Las primeras evidencias de las propiedades terapéuticas de preparados del cannabis aparecen en China y tienen más de 5000 años de antigüedad. A partir de este momento, aparecen numerosos documentos en los que se relatan diferentes aplicaciones medicinales de la *Cannabis Sativa* en diversas civilizaciones. Sin embargo, la utilización del cannabis en las sociedades occidentales tiene su comienzo a principios del siglo XIX.

La *Cannabis sativa* contiene más de 460 compuestos químicos diferentes, de los cuales más de 60 están agrupados bajo el término “cannabinoides”, que hace referencia a las sustancias que tienen una estructura carbocíclica de 21 carbonos. En 1964, Gaoni y Mechoulam aíslan y determinan la estructura del principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta, Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) (Figura 3).

Inicialmente, debido a la naturaleza lipofílica de la molécula, se pensó que el Δ^9 -THC ejercía su acción a través de interacciones no específicas con las membranas celulares. Sin embargo, estudios detallados de relación estructura-actividad sugirieron un mecanismo específico, mediado por receptor, como el responsable de su actividad, surgiendo a un amplio debate que no se resolvió hasta 25 años después de la caracterización del Δ^9 -THC.



Adaptación de Tela Botanica, Institut de Botanique, Montpellier.

Hasta el momento se han aislado dos tipos de receptores cannabinoides denominados CB1 y CB2 (Devane y col., 1988; Matsuda y col., 1990; Munro y col., 1993). El descubrimiento de los receptores para cannabinoides llevó a la búsqueda de los ligandos endógenos que actúan sobre ellos. De esta forma se describieron dos de los endocannabinoides más importantes, primero en el año 1992: la araquidonoil etanolamida (anandamida o AEA) (Devane y col., 1992) y en 1995 el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Mechoulam y col., 1995).

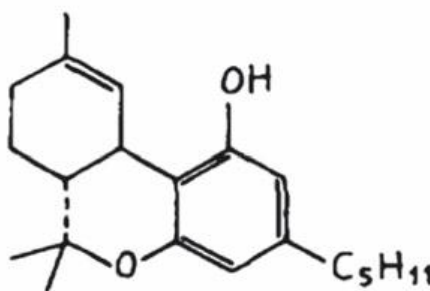


Figura 3. - Δ^9 -THC. Dibujo original de Mechoulam y Gaoni, 1967.

El descubrimiento en los años 90 de que receptores acoplados a proteínas G mediaban los efectos del mayor componente psicoactivo de la *Cannabis sativa*, el Δ^9 -THC (Gaoni y Mechoulam, 1971), llevó a la descripción de un sistema endógeno que hoy recibe el nombre de sistema cannabinoide endógeno o sistema endocannabinoide (SEC). Este sistema consta de: receptores, ligandos endógenos (endocannabinoides) y de los enzimas responsables de su síntesis y degradación.

4.1 Receptores cannabinoides

Los receptores cannabinoides pertenecen a la familia de receptores de 7 dominios transmembrana (Figura 4) acoplados a proteínas G, principalmente Gi/o.

El primer receptor, caracterizado por métodos radiométricos, fue el receptor CB1 (Devane y col., 1988), cuya estructura molecular fue identificada poco tiempo después en la rata (Matsuda y col., 1990) y en el ser humano (Gérard y col., 1991). El receptor CB1 está muy conservado entre especies, siendo la homología de secuencia entre humano y ratón del 91% y entre el humano y la rata del 90% (Valenti y col., 2005), encontrándose ampliamente distribuido por el SNC.

Se le atribuye un papel importante como modulador de la liberación de distintos neurotransmisores (Howlett y col., 2002), siendo en humanos el responsable de la mayoría de los síntomas derivados del consumo de marihuana (Huestis y col., 2001). Existe una variante que resulta de un “splicing” alternativo del receptor CB1, aislada de pulmón humano denominada CB1A (Shire y col., 1995).

Poco después de la caracterización molecular de los receptores CB1 se describió el receptor CB2 en células del sistema inmune (Munro y col., 1993). Los receptores CB2 exhiben una homología global del 44% (68% en las regiones transmembrana) en las regiones transmembrana con los receptores CB1. También presenta mucha más divergencia en cuanto a su homología entre especies, siendo ésta solo del 81% entre la rata y el humano (Begg y col., 2005).

Por último, en estudios realizados con ratones *knock-out* para CB1 (CB1^{-/-}) o CB2 (CB2^{-/-}) se ha observado que algunos de los efectos de los endocannabinoides no están mediados por ninguno de estos receptores (Howlett, 2004).

Se ha sugerido que algunos de estos efectos podrían ser explicados por ciertas propiedades químicas de los ligandos cannabinoides y no estarían mediados por receptores específicos. Este sería el caso, por ejemplo, de los efectos atribuidos a las propiedades antioxidantes de ciertos ligandos cannabinoides, o a sus propiedades lipofílicas, que podrían producir interacciones inespecíficas a nivel de la membrana plasmática o en diferentes sitios intracelulares (Begg y col., 2005). Sin embargo, hay otras evidencias que no pueden ser explicadas por estos mecanismos, y que sugieren la existencia de otro(s) receptor(es) cannabinoide(s). También se ha especulado con la existencia de un hipotético CB3, implicado en control de la ingesta de leche en ratones recién nacidos (Fride y col., 2003) y de un receptor endotelial para anandamida, cuya activación provoca vasodilatación mesentérica, y que tiene como antagonista al cannabidiol (CBD) y como agonista al CBD-anormal (Járai y col., 1999).

4.1.1 Distribución de los receptores CB1

Este receptor es el más abundante en cerebro de mamíferos. Su distribución ha sido bien estudiada en cerebro de rata (Herkenham y col., 1991a; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Tsou y col., 1998) y también en cerebro humano (Glass y col., 1997).

La mayor expresión del receptor CB1 se encuentra en los ganglios basales, corteza cerebral, cerebelo e hipocampo. Por el contrario, la presencia del receptor CB1 es menor en la sustancia gris periacueductal, tallo cerebral, ciertos núcleos del tálamo, amígdala, asta dorsal de la médula espinal, ventrículos y áreas subventriculares (Suárez y col., 2010).

Esta distribución de los receptores CB1 da una idea de la importancia del sistema cannabinoide endógeno en el control del movimiento, en el procesamiento de la memoria y en la modulación del dolor. Hay presencia del receptor CB1 también a nivel de células no neuronales como en los astrocitos (Bouaboula y col., 1995; Sanchez y col., 1998), microglía (Waksman y col., 1999; Walter y col., 2003), y oligodendrocitos (Molina-Holgado y col., 2002; Mackie, 2005). Su expresión es mayoritariamente pre-sináptica, en axones y terminales nerviosos, donde puede mediar la inhibición de la liberación de neurotransmisores, aunque también puede estar presente en las dendritas y soma de neuronas (Howlett y col., 2002). Su distribución se extiende también por tejidos y órganos periféricos, la glándula adrenal, glándula pituitaria, corazón, hígado, bazo, así como en el sistema reproductor, sistema urinario y sistema gastrointestinal (Galiegue y col., 1995; Gérard y col., 1991; Mackie, 2005; Pazos y col., 2008).

4.1.2 Distribución de los receptores CB2

La distribución de los receptores CB2 es muy distinta a la de los CB1. Inicialmente, el receptor CB2 fue identificado en niveles elevados en bazo y en células del sistema inmune (Munro y col., 1993; Galiegue y col., 1995) y en menor concentración en músculo, hígado, intestino, testículo (Liu y col., 2009) y tejido adiposo (Roche y col., 2006).

El receptor CB2 se expresa en cerebro fundamentalmente en condiciones patológicas, como en tumores (Joosten y col., 2002), glioma (Guzman y col., 2001), dolor neuropático (Ibrahim y col., 2003), placas seniles en la enfermedad de Alzheimer (Ehrhart y col., 2005) y placas de ateroma (Steffens y col., 2005), mientras que en los primeros estudios no se encontraba expresión del receptor CB2 en cerebro sano (Chakrabarti y col., 1995; Schatz y col., 1997; Griffin y col., 1999; Carlisle y col., 2002).

Con posterioridad los receptores CB2 han sido también identificados en cerebelo y tronco encefálico (Van Sickle y col., 2005).

En general, los receptores CB2 se expresan a niveles más bajos en cerebro sano y están incrementados en cerebro inflamado o dañado predominantemente en células gliales (Benito y col., 2003; Maresz y col., 2005; Nuñez y col., 2008), como por ejemplo tras la administración de neurotoxina dopaminérgica (Ashton y col., 2007; Price y col., 2009). A nivel de la glia, el receptor CB2 puede ser considerado un receptor inducible, que puede tener un papel en procesos neuroinflamatorios que evolucionan en algunas formas de degeneración (Brown y col., 2010). Más recientemente, otros estudios han descrito la presencia del receptor CB2 en condiciones fisiológicas normales en diferentes regiones cerebrales, que incluyen corteza cerebral, hipocampo, estriado, amígdala, sustancia gris periaqueductal y núcleos hipotalámicos (Gong y col., 2006; Onaivi y col., 2006a; García-Gutiérrez y col., 2010): tras años de gran controversia, ahora se acepta que la distribución de CB2 no es estrictamente periférica y que también se encuentra en el SNC en células progenitoras neuronales, neuronas, microglía, células endoteliales y gliales (Palazuelos y col., 2006; Brusco y col., 2008; Chin y col., 2008; Viscomi y col., 2009; Onaivi., 2011).

4.1.3 “Candidatos” a receptores cannabinoides

Recientemente, varios estudios sugieren la existencia de receptores cannabinoides adicionales, distintos de CB1 y CB2, capaces de mediar efectos específicos en la transmisión sináptica, el sistema vascular y el sistema inmune.

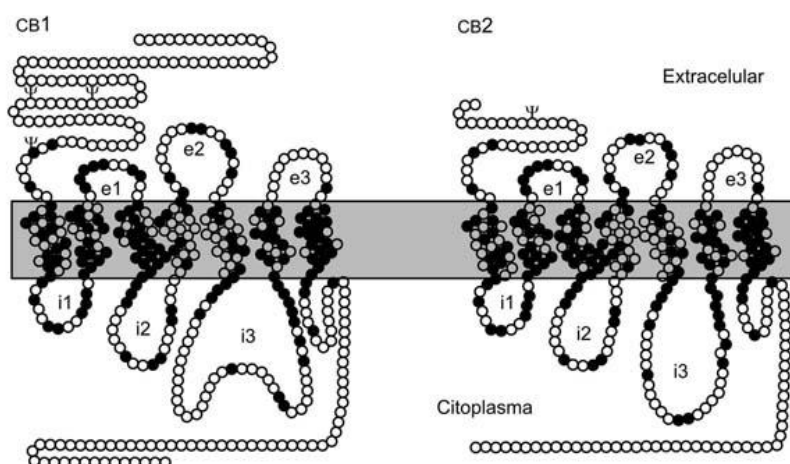


Figura 4. - Representación esquemática de los receptores CB1 y CB2. Los receptores tienen siete segmentos transmembrana. Círculos negros= Aminoácidos comunes a los dos receptores; Círculos vacíos= aminoácidos diferentes; (e1, e2, e3) son asas extracelulares; (i1, i2, i3) son asas intracelulares.

GPR55 (receptor huérfano acoplado a proteínas G)

El primero de los nuevos candidatos a receptor cannabinoide es el receptor GPR55, que se expresa en varios tejidos y que parece estar relacionado con la función vascular y con el control de la nocicepción (Baker y col., 2006; Balenga y col., 2011). Este receptor ha sido caracterizado por Ryberg y col., (2007), quienes han clonado y determinado su secuencia en rata, ratón y humano. GPR55 se expresa en cerebro, con un patrón de expresión diferente en rata y humano, pero también en tejido periférico (Sawzdargo y col., 1999; Ryberg y col., 2007). Varios cannabinoides, incluyendo endógenos (AEA, 2-AG, palmitoil etanolamina (PEA), oleoil etanolamina (OEA), virodamina), naturales (Δ^9 -THC) y sintéticos (CP-55940, O-1602), se comportan como agonistas de GPR55 (Lauckner y col., 2008). Además, PEA, 2-AG y virodamina ejercen una acción más potente a través de este receptor, que a través de CB1 o CB2.

Ciertos estudios señalan que este posible receptor cannabinoide es capaz de activar rutas de señalización diferentes a las usadas por CB1 y CB2, e incrementar la excitabilidad neuronal (Lauckner y col., 2008; Sugiura y col., 2009).

Receptor “anormal-cannabidiol” GPR18

Este receptor se localiza en el endotelio vascular, donde media la vasorelajación de la arteria mesentérica, siendo “anormal-cannabidiol” y O-1918 su agonista y antagonista selectivos respectivos (Offertáler y col., 2003). También se sugiere su implicación en procesos de angiogénesis, puesto que es capaz de modular la migración de las células del endotelio vascular vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) (Mo y col., 2004).

Receptor vanilloide TRPV1

TRPV1 es un receptor ionotrópico, activado por capsaicina, el ingrediente activo del chile picante, y resiniferatoxina (Caterina y col., 1997) que se expresa en el SNC en neuronas sensoriales primarias y también en células no neuronales (Mezey y col., 2000; Sanchez y col., 2005). Algunos endocannabinoides pueden actuar sobre los receptores TRPV1. Los receptores TRPV1 y CB1 comparten los ligandos AEA y N-araquidonoil-dopamina (NADA) (Zygmunt y col., 1999), y se co-expresan en grupos de neuronas de los sistemas nerviosos periférico y central (Cristino y col., 2006). El endocanabinoide AEA es capaz de modular la activación de TRPV1, teniendo una implicación potencial en el tratamiento de desórdenes inflamatorios, respiratorios y cardiovasculares (Rev. en Ross, 2003) y el endocanabinoide NADA produce efectos antinociceptivos a nivel espinal a través de este receptor (Farkas y col., 2011).

Se ha descrito que, aunque en condiciones fisiológicas la potencia de la anandamida para inducir los efectos mediados típicamente por receptores TRPV1 es entre 5 y 20 veces menor que su potencia sobre los receptores CB1, en condiciones patológicas esta potencia podría verse incrementada hasta 10 veces (Di Marzo y col., 2002), de modo que la lista de los efectos farmacológicos de los endocannabinoides mediados por TRPV1 es cada vez más amplia. Por ello se ha sugerido que los receptores TRPV1 y CB1 podrían ser considerados como los receptores ionotrópicos y metabotrópicos, respectivamente, para la misma clase de amidas de ácidos grasos endógenos, como la anandamida y la NADA (Di Marzo y col., 2002).

Receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs)

Los PPARs son una familia de factores de transcripción nucleares, pertenecientes a la superfamilia de receptores esteroideos, que incluye tres isoformas: PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ . Los PPARs heterodimerizan con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) y se unen a elementos de respuesta induciendo la transcripción de genes diana involucrados en la regulación del metabolismo lipídico, diferenciación celular e inflamación (Ferre, 2004; Moraes y col., 2006; Stienstra y col., 2007). En particular, la activación de las isoformas PPAR α y γ produce efectos antiinflamatorios en varios tejidos, SNC incluido. Otros estudios han demostrado que la isoforma PPAR α está involucrada en la regulación de procesos cognitivos y comportamentales (Mazzola y col., 2009; Melis y col., 2010; Mascia y col., 2011). Las tres isoformas se expresan en el cerebro y en el sistema nervioso periférico (Moreno y col., 2004).

Estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que PPAR β/δ es la isoforma prevalente en el cerebro, y que se encuentra en todos los tipos celulares, mientras que PPAR α se expresa predominantemente en astrocitos a muy bajo nivel (Basu-Modak y col., 1999). Los astrocitos poseen los tres isotipos de PPAR, aunque en rangos diferentes dependiendo del área del cerebro y edad del animal (Cristiano y col., 2001). La isoforma α es dominante en microglía (Cullingford y col., 1998).

En los últimos años, numerosas evidencias sugieren que los cannabinoides, y en particular los endocannabinoides, pueden activar la familia de receptores nucleares PPAR a través de rutas directas o indirectas y mediar respuestas fisiológicas que incluyen regulación de la alimentación, pérdida de peso, lipólisis, analgesia y efectos antiinflamatorios (Sun y Benett, 2007). Así OEA a través de la activación de PPAR α regula el apetito y peso corporal, estimula la lipólisis y tiene efectos neuroprotectores (Fu y col., 2003; Guzmán y col., 2004; LoVerme y col., 2005; Sun y col., 2006). También PEA presenta propiedades antiinflamatorias y analgésicas mediadas por PPAR α (LoVerme y col., 2005) ya que atenúa la inflamación *in vivo* en ratones wild-type pero no en ratones knock-out para el receptor PPAR α (LoVerme y col., 2005) y contrarresta la astrogliosis reactiva inducida por el péptido β -amiloide (Scuderi y col., 2011).

Otros endocannabinoides que activan PPAR α son AEA, virodamina, noladin éter y OEA (Sun y col., 2006). En un modelo de isquemia cerebral en ratón (oclusión de la arteria cerebral media) los tratamientos con OEA redujeron el volumen del infarto en un mecanismo neuroprotector mediado por PPAR α , ya que el volumen del infarto no estaba modificado tras tratamiento con OEA en los animales deficientes para el receptor. Los endocannabinoides, AEA y 2-AG, y el ácido ajulémico tienen propiedades antiinflamatorias mediadas por PPAR α (Liu y col., 2003a; Rockwell y col., 2006). Además agonistas PPAR α han mostrado efectos antiinflamatorios y neuroprotectores en modelos experimentales de enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y esclerosis múltiple (Bernardo y Minghetti., 2008).

En resumen, hay evidencias que sugieren que algunos cannabinoides producen neuroprotección actuando como agonistas PPARs.

4.2 Mecanismos de transducción de señal activados por receptores cannabinoides

Los principales mecanismos intracelulares en los que están implicados los receptores de cannabinoides CB1 incluyen la inhibición de la adenilil ciclasa, la regulación de diferentes canales iónicos y la activación de la vía de las MAPKs (Howlett, 1998).

El acoplamiento de estos receptores a proteínas Gi/o constituye la base de la mayoría de estos efectos. En cuanto al receptor CB2, su activación también conduce a una inhibición de la adenilil ciclasa y activación de la vía de las MAPKs y trabajos recientes sugieren que el receptor CB2 puede modificar las corrientes de Ca²⁺ y K⁺ (Atwood, 2011) y activar la vía PI3-k/Akt (Viscomi y col., 2009).

4.2.1 Adenilil ciclasa

La activación de los receptores cannabinoides produce la inhibición de la adenilil ciclasa a través de la subunidad α de las proteínas G. Este enzima cataliza la conversión de ATP en AMPc (Adenosina-3', 5' monofosfato cíclico) de manera que la estimulación de receptores cannabinoides da lugar a una disminución de la concentración de AMPc intracelular (Bayewitch y col., 1995).

4.2.2 Canales iónicos

Los cannabinoides modulan diferentes canales iónicos dependientes de voltaje a través del dímero $\beta\gamma$ de las proteínas G. Principalmente canales de calcio tipo N- y P/Q y canales del potasio tipo A. La mayoría de los efectos producidos dependen directamente de la activación del receptor CB1 al que están acoplados, pero existen evidencias que sugieren una activación directa por parte de los cannabinoides sobre el canal iónico. Los canales de calcio sensibles a voltaje son proteínas multiméricas situadas en la membrana celular que se abren cuando hay un cambio de potencial en la membrana, dejando pasar el Ca^{2+} a su través aumentando su concentración intracelular (Figura 5).

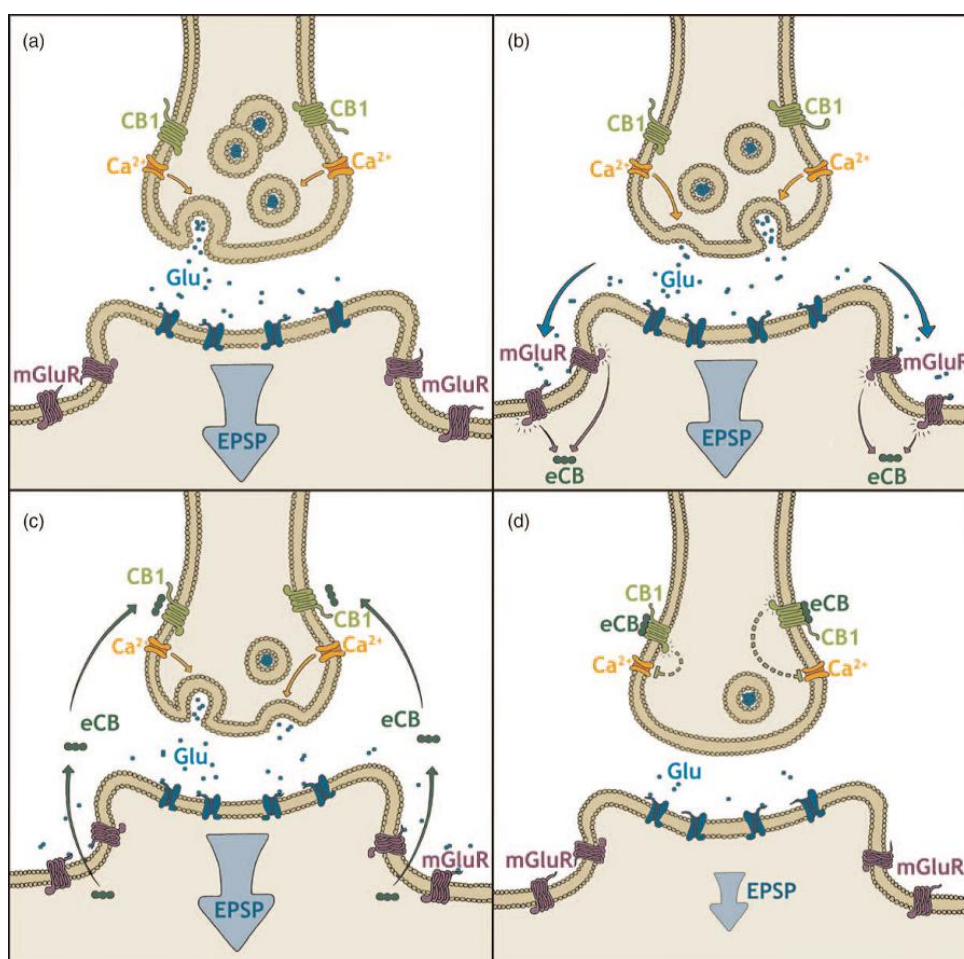


Figura 5. - Modelo hipotético de señalización EC retrógrada a nivel de una sinapsis glutamérgica. (a) El glutamato (Glu) activa los receptores post-sinápticos glutamatergicos ionotrópicos causando un potencial post-sináptico excitatorio (EPSP). (b) El Glu activa los receptores metabotrópicos de glutamato acoplados a proteínas G (mGluR). Una segunda cascada mensajera provoca la síntesis de eCB. (c) Los eCB activan los receptores CB1 presinápticos acoplados a proteínas G (d) La activación CB1 inhibe la liberación de Glu bloqueando la entrada de Ca^{2+} en la célula presináptica. El EPSP es atenuado. (Adaptación de Riebe y Wotjak, 2011).

Este aumento provoca, en la mayoría de los casos, la liberación de sustancias de la célula por mecanismos de exocitosis, como ocurre en la liberación de neurotransmisores por la neurona presináptica (Jarvis y Zamponi 2001). Se ha demostrado que los cannabinoides, a través de la proteína Gi/o, inhibe los canales de calcio tipo N- y P/Q- mayoritarios en la neurona presináptica (Schlicker y Kathmann 2001). Esto hace posible un efecto modulador de los cannabinoides en la liberación de los neurotransmisores, lo que podría explicar muchas de sus efectos biológicos. Se ha demostrado que los cannabinoides también pueden inhibir canales de calcio de tipo L en la musculatura lisa de arterias, lo que se correlaciona con el papel vasodilatador que pueden tener estos compuestos (Howlett y Mukhopadhyay, 2000).

Los cannabinoides también están acoplados a canales de potasio dependientes de voltaje, encargados de regular la concentración basal de este ión en la célula y a canales de potasio activados por proteínas G (Robbe y col., 2001; Hampson y col., 1995). La unión de los cannabinoides a su receptor activa los canales que contribuyen a facilitar la salida de K⁺ de la célula, dificultando así la restauración del nivel basal.

4.2.3 Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)

Los cannabinoides también pueden activar la superfamilia de las MAPKs a través de la subunidad $\beta\gamma$ de la proteína Gi/o (Bouaboula y col., 1995a; Derkinderen y col., 2003; Rubino y col., 2004). En mamíferos hay descritos al menos cuatro grupos de cascadas MAPKs con diferentes funciones biológicas y cada grupo se activa en respuesta a distintos estímulos. De esta forma, los cannabinoides son capaces de regular la diferenciación, crecimiento y muerte celular (Guzmán y col., 2001). Además, los cannabinoides activando la vía de las quinasas PI3K/PDK/PKB pueden participar a la regulación del metabolismo de la glucosa y del crecimiento celular (Gómez del Pulgar y col., 2000) y también pueden producir efectos antiapoptóticos (Bouaboula y col., 1997, Sánchez y col., 1998) lo que indica que los cannabinoides tienen un papel importante en la supervivencia celular.

4.2.4 Producción de óxido nítrico

El NO es un radical libre que se forma por la acción del enzima óxido nítrico sintasa (NOS), y que puede actuar como mensajero de determinadas funciones fisiológicas. Hay tres tipos de isoformas NOS, la que se expresa constitutivamente en algunas células (nNOS) como neuronas, la que se expresa mayoritariamente en células endoteliales (eNOS), y la inducible (NOS-2) que se genera en respuesta a determinados estímulos generalmente relacionados con la inflamación. Se ha visto que los cannabinoides aumentan la producción de NO principalmente a través de la activación de nNOS (Fimiani y col., 1999). El enzima nNOS produce pequeñas cantidades de NO, que puede mediar la relajación de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos actuando como vasodilatador, intervenir en la neurotransmisión como mensajero retrógrado, en la plasticidad sináptica y en la morfogénesis neuronal.

4.2.5 Fosfolipasa D (PLD) y fosfolipasa A₂ (PLA₂)

Otra de las posibles vías de acción de los cannabinoides es la formación de ácido araquidónico (AA). Este ácido graso poli-insaturado puede formarse por la acción del enzima PLA₂ o del enzima PLD. Ambas pueden ser activadas por los cannabinoides, aunque no en todos los tipos celulares, produciéndose una acumulación de AA (Burstein y col., 1994). Otros mecanismos que inducen los cannabinoides, como la activación de la cascada de MAPK, el incremento de Ca²⁺ intracelular o activación de proteína quinasa C (PKC), pueden estimular también a la PLA₂. El AA puede metabolizarse en la célula dando lugar a prostaciclina, tromboxanos y prostaglandinas que tienen sus propias actividades biológicas lo que amplifica el rango de acciones fisiológicas de los cannabinoides. Además, el AA puede ejercer un efecto directo activando enzimas, canales iónicos y receptores nucleares.

4.2.6 Regulación de la expresión de genes

La mayoría de las cascadas de transducción intracelulares desembocan en la activación de proteínas que son factores de transcripción. Estas van al núcleo donde regulan la expresión de determinados genes que darán lugar al aumento de producción de proteínas responsables de un efecto biológico determinado (Komeili y O'Shea, 2000). Los cannabinoides, tras incidir sobre la cascada de las quinasas, pueden modular factores de transcripción inducibles.

En concreto, se ha observado que los cannabinoides pueden activar genes de expresión temprana Krox-24 (Bouaboula y col., 1995b) y modular los factores Fos/Jun (Mailleux y col., 1994) y NF- κ B (Kaminski 1998).

Sección 5

Farmacología de los cannabinoides

5.1 Endocannabinoides

Estos compuestos endógenos, capaces de unirse a los receptores cannabinoides y activarlos funcionalmente, son sintetizados y liberados sólo “a demanda”, es decir, cuando y donde son necesarios, siguiendo estímulos psicológicos o patológicos. Posteriormente, son recaptados y degradados enzimáticamente en el interior de la célula. Hasta la fecha se han identificado distintos endocannabinoides, todos ellos derivados del ácido araquidónico, aunque los más importantes son AEA y 2-AG:

N-araquidonil-etanolamida (AEA)

También conocida como anandamida, se aisló de cerebro porcino y se identificó como cannabinoide endógeno en 1992 por Devane y cols. AEA puede actuar como ligando de los receptores CB₁, CB₂, TRPV1 (Zygmunt y col., 1999) y PPAR α (Bouaboula y col., 2005).

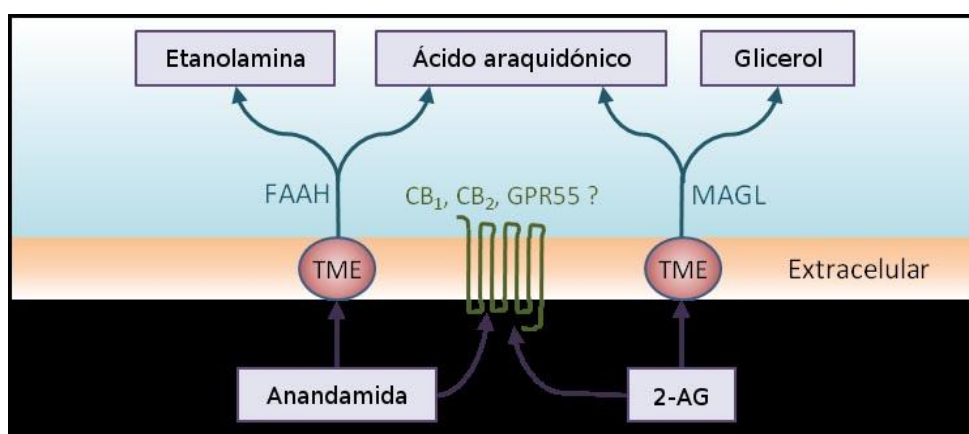


Figura 6. - Síntesis e inactivación de AEA y 2-AG. Los dos principales endocannabinoides AEA y 2-AG liberados en el espacio extracelular activan los receptores cannabinoides y son translocados al interior de las células por un transportador específico (TME). La degradación de AEA produce etanolamina y ácido araquidónico. 2-AG es mayormente degradado por la MAGL cuya acción produce ácido araquidónico y glicerol. (Adaptado de Di Marzo y col., 2008).

Tiene una afinidad por CB1 similar a Δ^9 -THC (Pertwee, 2004) y dependiendo del tejido y la respuesta biológica que se mida, se comporta como agonista parcial o total del receptor CB1. Como agonista parcial de CB2 tiene muy baja eficiencia, pudiendo incluso actuar como antagonista (Gonsiorek y col., 2000).

La producción de AEA no se restringe a neuronas ya que astrocitos y microglía, entre otros tipos celulares también la producen (Felder y col., 1996; Schmid y col., 1997; Walter y col., 2003).

La principal ruta de síntesis de AEA (rev. en Pacher y col., 2006) a partir de fosfolípidos de membrana (Figura 6), es a través de una reacción en dos pasos, donde se produce la transferencia enzimática de ácido araquidónico de la posición *sn*-1 de fosfatidilcolina (PC) al grupo amino de fosfatidiletanolamina (PE), formando *N*-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE). El precursor NAPE es entonces hidrolizado a AEA por una PLD. Esta fosfolipasa es selectiva para NAPEs (NAPE-PLD) y se ha clonado recientemente. En estómago, el precursor *N*-acil-fosfatidiletanolamina también puede ser hidrolizado por la PLA₂ y el producto, *N*-acil-lisofosfatidiletanolamina, es entonces metabolizado por una liso-PLD, formando varias *N*-aciletanolaminas, y entre ellas AEA. En macrófagos RAW246.7, la producción de AEA inducida por lipopolisacárido (LPS) parece seguir también una ruta alternativa donde NAPE es hidrolizada a fosfo-AEA, y ésta posteriormente desfosforilada (Liu y col. 2006).

2-Araquidonil glicerol (2-AG)

Este segundo endocannabinoide (Figura 7) se identificó en 1995 en intestino canino (Mechoulam y col., 1995) y cerebro de rata (Rev. en Sugiura, 1995). 2-AG se comporta como agonista de CB1 y CB2, aunque parece que con una potencia menor que AEA y puede estimular directamente los receptores GABA_A (Sigel y col., 2011). Los niveles basales de 2-AG en cerebro son mucho mayores que los de AEA, aunque sólo una fracción del total es la que probablemente esté involucrada en la señalización cannabinoide, puesto que 2-AG también interviene en el metabolismo lipídico (Rev. en Sugiura, 2006). 2-AG se sintetiza a partir de la hidrólisis de diacilglicerol (DAG) por una DAG lipasa selectiva para la posición *sn*-1.

Por su parte, DAG puede generarse a partir de la hidrólisis de, o bien fosfoinosítidos (PI), catalizada por una fosfolipasa C selectiva para PI (PI-PLC), o bien ácido fosfatídico (PA), catalizada por una PA fosfohidrolasa (Rev. en Sugiura, 2006).

Palmitoiletanolamida (PEA)

La PEA (Figura 7) es una aciletanolamida que puede tener acciones que no han sido atribuidas a la activación de los receptores cannabinoides clásicos y que probablemente están mediadas por receptores PPAR α (D'Agostino y col. 2009), GPR55 y GPR119 (Godlewsky y col., 2009). La PEA es capaz de potenciar la actividad de AEA y 2-AG a través de un mecanismo llamado “*efecto entourage*” (Ben-Shabat y col., 1998; Mechoulam y col., 2002; Smart y col., 2002) junto a derivados de ácidos grasos endógenos como la estearoiletanolamida (SEA), OEA, araquidonilglicina, 2-lineoilglicerol y 2-palmitoilglicerol y oleamida (rev. en Hanus, 2007). La PEA tiene efectos antiinflamatorios (Lo Verme y col., 2005), antinociceptivos (Calignano y col., 2001) anticonvulsivantes (Lambert y col., 2001) y antidepresivos (Yu y col., 2011).

Oleoiletanolamida (OEA)

La OEA (Figura 7) es otra aciletanolamida que tiene efectos inhibidores de la ingesta, estimula la lipólisis y regula el peso corporal actuando sobre receptores PPAR α (LoVerme y col., 2005; Gaetani y col., 2008). Además ha sido demostrado que OEA se une al receptor cannabinoide GPR119 (Overton y col., 2006).

5.2 Fitocannabinoides

Con este término se designa a los más de 60 cannabinoides presentes en la planta *Cannabis sativa*. Los más importantes son:

Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)

Es el primer constituyente aislado (Gaoni y Mechoulam, 1964), y el responsable de la propiedades psicoactivas del *cannabis*. Se comporta como agonista parcial de CB1 y CB2, y dependiendo del nivel de expresión y la eficiencia en el acoplamiento a esos receptores, activará o bloqueará su activación por otros cannabinoides (rev. en Pertwee, 2008).

Δ^8 -tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC)

Sólo aparece en algunas variedades de la planta y su concentración es muy pequeña en comparación con la de Δ^9 -THC. Su perfil farmacológico es muy parecido a Δ^9 -THC, aunque sus efectos son más débiles (Mechoulam y col., 1972).

Cannabinol (CBN)

Fue el primer cannabinoide obtenido en una forma pura (rev. en Mechoulam y Hanus, 2000), y presenta mayor afinidad por el receptor CB2 que por CB1. También tiene propiedades psicoactivas, pero son aproximadamente una décima parte de las descritas para Δ^9 -THC (Munro y col., 1993).

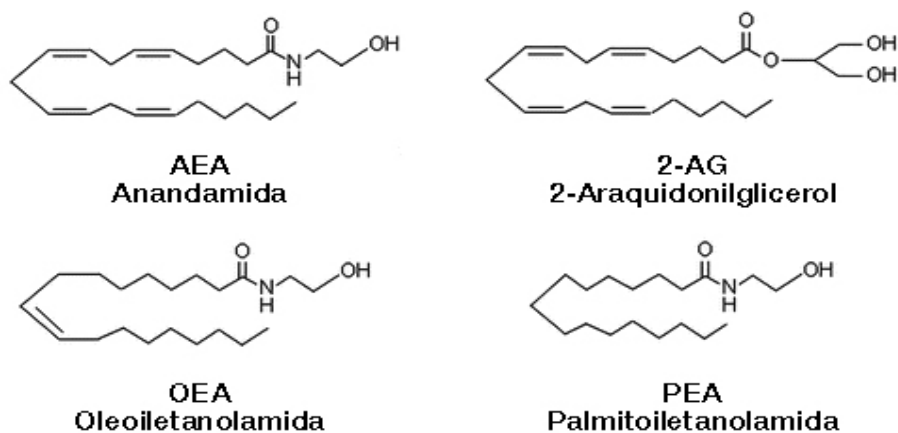


Figura 7. - Estructura química de algunos endocannabinoides.

Cannabidiol (CBD)

Es el principal constituyente no psicoactivo del *cannabis* y un potente antioxidante. Tiene muy poca afinidad por los receptores cannabinoides, aunque, se ha señalado que puede actuar como antagonista de los agonistas de CB1 y CB2 (Pertwee, 2008; Izzo y col., 2009) y facilitar la neurotransmisión mediada por endocannabinoides, disminuyendo la hidrólisis o la recaptación de AEA (Bisogno y col., 2001). CBD puede activar también los receptores TRPV1 (Bisogno y col., 2001; Marco y col., 2011) y ha mostrado actividad antiinflamatoria a través de la modulación del receptor de adenosina A2 (Ribeiro y col., 2012). CBD tiene efectos biológicos de potencial interés terapéutico en neuroprotección, náuseas, emesis, isquemia cerebral, diabetes tipo 1, artritis reumatoide y cáncer (rev. en Mechoulam y col., 2007). Además ha mostrado actividad ansiolítica (Alves y col., 2010; Lemos y col., 2010; Soares y col., 2010; Gomes y col., 2011) y antiinflamatoria limitando el aumento inducido por ATP de los niveles de Ca^{2+} intracelular y la producción de NO en cultivos de microglía (Martin-Moreno y col., 2011). Otro estudio demuestra que los efectos antidepresivos de cannabidiol podrían estar mediados por los receptores serotoninérgicos 5-HT1A (Zanelati y col., 2010).

5.3 Ligandos sintéticos

Desde que se descubrió la estructura del Δ^9 -THC, una parte importante de la investigación en cannabinoides ha estado dirigida a la obtención de compuestos análogos con mejores características farmacológicas, tanto farmacocinéticas como, sobre todo, farmacodinámicas, que este ligando natural. Estudios de relación estructura-actividad han originado compuestos cannabimiméticos con mayor afinidad y especificidad. En un sentido amplio, se considera que un compuesto tiene actividad cannabimimética si es capaz de desencadenar efectos similares al Δ^9 -THC (Pertwee, 1997; Di Marzo y col., 1998).

5.4 Agonistas de receptores cannabinoides

Los agonistas de los receptores cannabinoides se pueden clasificar en cuatro grupos diferentes en función de su estructura química: cannabinoides clásicos, cannabinoides no clásicos, aminoalquilindoles y eicosanoides.

5.4.1 Cannabinoides clásicos

Son cannabinoides derivados de la planta *Cannabis Sativa* (Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, cannabinal y cannabidiol) y compuestos de síntesis con estructura análoga (11-hidroxi- Δ^8 -THC-dimetilheptilo (HU-210), el 11-hidroxi-hexahidrocannabinol-dimetilheptilo (HU-243) y la nabilona). Todos ellos son derivados de dibenzopirano con diferentes sustituyentes laterales y grados de insaturación. La mayoría de los compuestos cannabinoides clásicos no exhiben selectividad en su unión con los receptores cannabinoides y sus valores de afinidad, tanto por los receptores CB1 como CB2, están en el mismo rango.

5.4.2 Cannabinoides no clásicos

Los cannabinoides no clásicos son análogos sintéticos bicíclicos y tricíclicos del Δ^9 -THC que carecen de anillo pirano y entre ellos destaca el P-55940. Esta molécula posee una estructura bicíclica y es 5 veces más potente que el Δ^9 -THC. El CP-55940 marcado radioactivamente ha sido uno de los cannabinoides más utilizados para el análisis de la unión a los receptores para cannabinoides. Al igual que los cannabinoides clásicos, estos tampoco presentan especificidad por alguno de los dos tipos de receptores CB1 o CB2, pudiendo unirse a ambos.

5.4.3 Aminoalquilindoles

Son moléculas que presentan una estructura química muy diferente al Δ^9 -THC. Son derivados de la pravadolina y el prototipo de estos agonistas es el WIN 55212-2 (Richter y Loscher, 1994) que se une tanto a los receptores CB1 como a los receptores CB2. La forma tritiada del WIN55,212-2 es probablemente el segundo radioligando más utilizado para el marcaje de receptores cannabinoides en distintos sistemas.

5.4.4 Eicosanoides

Dentro de este grupo están los endocannabinoides y entre ellos los mejor caracterizados son la AEA y el 2-AG. Tras el descubrimiento de estos ligandos endógenos (Devane y col., 1992) se inició el desarrollo de una serie de compuestos estructuralmente derivados del AA. Cabe destacar la α -(+)-araquidonoil-1'-hidroxi-2'-propilamida, conocida como la R-metanandamida (Khanolkar y col., 1996).

Su principal particularidad es que es más resistente a la degradación metabólica que la AEA (Abadji y col., 1994). En este grupo se encuentran también la araquidonoil-2-cloroetilamida (ACEA), la araquidonoilciclopropilamida (ACPA)(Hillard y col., 1999) y el O-812 (Di Marzo y col., 2001a), que son agonistas selectivos del receptor CB1. Otro compuesto que activa de manera indirecta el sistema cannabinoide es el paracetamol, cuyo producto, la amina p-aminofenol, se conjuga con el ácido araquidónico para formar la N-araquidonoilfenolamina, un compuesto ya conocido como cannabinoide endógeno (AM404) (Bertolini y col., 2006).

Sección 6

Mecanismo de inactivación endocannabinoides

Los endocannabinoides, como ocurre con los neurotransmisores clásicos, tienen un sistema específico de inactivación encargado de terminar su actividad biológica. Esta inactivación tiene lugar a través de un proceso de dos pasos que incluye la retirada del medio del ligando y su degradación enzimática en el interior de la célula.

6.1 Recaptación de endocannabinoides

En un principio, debido a la estructura hidrofóbica de los endocannabinoides, se consideró que el transporte de estos ligandos a través de la membrana celular era un proceso pasivo. Sin embargo, en 1994 Di Marzo y col. sugieren que la acumulación de AEA en neuronas es a través de un proceso de difusión facilitada, mediado por una proteína transportadora presente en la membrana. Años más tarde, varios estudios confirman que la recaptación de AEA es un proceso de transporte facilitado, es decir, un proceso rápido, saturable, específico, dependiente de la temperatura e independiente de Na^+ y de ATP (Beltramo y col., 1997; Hillard y col., 1997; Maccarrone y col., 2000). El transporte de endocannabinoides se ha estudiado y caracterizado en neuronas, células gliales y líneas celulares centrales y periféricas (Beltramo y col., 1997; Hillard y col., 1997; Maccarrone y col., 2000).

Recientemente ha sido identificada una variante parcialmente citosólica del enzima que degrada la anandamida amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH), denominada FLAT (FAAH-like anandamide transporter) que facilita su translocación en neuronas y cuya actividad se bloquea por inhibidores del transporte de anandamida, como AM404 y OMDM-1 (Fu y col., 2011; Marsicano y Chaoulouff, 2012). Un estudio ha identificado a las proteínas que unen ácidos grasos (FABPs) como los primeros transportadores intracelulares de AEA (Kaczocha y col., 2009).

Otros mecanismos de recaptación que se han propuesto son: a) difusión simple a través de la membrana, regulada por la hidrólisis de AEA (Kaczocha y col., 2006), b) difusión simple y secuestro de AEA intracelular por una proteína o compartimiento lipídico (Hillard y Jarrahan, 2003), c) internalización de AEA independiente de su hidrólisis enzimática (Fegley y col., 2004; Hillard y col., 2007) y d) endocitosis mediada vía *caveolin/lipids rafts* (McFarland y col., 2004). Aunque el mecanismo responsable de la acumulación de AEA no está resuelto, se han desarrollado y caracterizado compuestos como AM404, VDM11, OMDM-1, OMDM-2 y UCM707, capaces de inhibir su recaptación (Rev. en Lambert y Fowler, 2005). En cuanto a la recaptación de 2-AG, se conocen pocos datos. Hasta el momento parece que el proceso de internalización es mediado por un transportador común para AEA y 2-AG, puesto que el compuesto AM404 es capaz de inhibir la recaptación de ambos endocannabinoides (Piomelli y col., 1999; Bisogno y col., 2001). También se propone que sean dos los transportadores que median el transporte de AEA y 2-AG, funcionalmente similares y selectivos para cada ligando, pero capaces de transportar ambos endocannabinoides con una eficacia similar (Bisogno y col., 2001).

6.2 Hidrólisis de AEA

Una vez en el interior de la célula, el enzima responsable de hidrolizar el enlace amida de AEA, dando lugar a ácido araquidónico y etanolamina, es FAAH (Figura 5). FAAH es una proteína integral de membrana, perteneciente a la familia de las amidasas, que ejerce su actividad principalmente en retículo endoplasmático y aparato de Golgi, y es capaz de hidrolizar varias *N*-aciletanolamidas y amidas primarias de ácidos grasos, como PEA, OEA y oleamida. Se clonó por primera vez en rata (Cravatt y col., 1996) y posteriormente en humano, ratón y cerdo, compartiendo todas ellas un 73% de homología de secuencia (Rev. en Lambert y Fowler, 2005). La distribución de FAAH varía entre especies. En rata, se distribuye principalmente en hígado, intestino delgado, cerebro, riñón, testículos, pulmón y bazo, y en humano, en páncreas, cerebro, riñón y músculo esquelético (Cravatt y col., 1996; Rev. en Lambert y Fowler, 2005).

En cerebro, FAAH se localiza en el soma y dendritas de células piramidales y de Purkinje en cerebelo, corteza e hipocampo (Egertová y col., 1998; Tsou y col., 1998b), regiones con un elevado nivel de expresión de CB1.

A pesar de la localización postsináptica del enzima (Gulyas y col., 2004), las neuronas FAAH positivas no se localizan postsinápticamente con respecto a las neuronas que expresan CB1, por tanto, el receptor y el enzima no presentan un patrón de expresión complementario (Egertová y col., 2003). FAAH también está presente en oligodendrocitos (Egertová y col., 2003) y astrocitos (Romero y col., 2002), siendo su expresión y actividad más elevadas en los astrocitos reactivos próximos a los depósitos de β -amiloide, característicos de la enfermedad de Alzheimer (Benito y col., 2003) y síndrome de Down (Nuñez y col., 2008). Más tarde, se ha identificado en humano y primates una segunda amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH-2), que comparte un 20% de homología de secuencia con FAAH (Wei y col., 2006). FAAH-2 también hidroliza amidas primarias de ácidos grasos y es sensible a las principales clases de inhibidores de FAAH, pero su distribución tisular es diferente (Wei y col., 2006). El desarrollo de inhibidores de FAAH (rev. en Lambert y Fowler, 2005), entre los que destacan URB597 y OL-135, ha permitido obtener efectos beneficiosos en modelos animales de dolor, ansiedad y depresión, eliminando los efectos secundarios que acompañaban a la activación de CB1 (Kathuria y col., 2003; Lichtman y col., 2004a; Gobbi y col., 2005).

Los ratones knock out para el enzima, en los que los niveles de AEA y otras *N*-aciletanolamidas son 10 veces superiores que en animales *wild type* (Cravatt y col., 2001), también muestran una menor sensibilidad al dolor (Lichtman y col., 2004b), como consecuencia del aumento del tono endocannabinoide. Más tarde, se ha generado un segundo modelo de ratones *knock out* para FAAH (Cravatt y col., 2004), en los que la expresión de el enzima se ha restringido al SNC. En este modelo, la analgesia parece ser mediada por la interacción de AEA con los receptores cannabinoides en el SNC, mientras que la actividad antiinflamatoria es mediada por los niveles periféricos elevados de amidas de ácidos grasos (Cravatt y col., 2004).

6.3 Hidrólisis de 2-AG

El endocannabinoide 2-AG también puede ser sustrato del enzima FAAH *in vitro* (Goparaju y col., 1998), pero no *in vivo*, puesto que los niveles de 2-AG en cerebro de ratones KO para FAAH no varían con respecto a los *wild type* (Pacher y col., 2005). 2-AG es hidrolizado por una monoacilglicérido lipasa (MAGL) (Figura 8)(Dinh y col., 2002), clonada en ratón (Karlsson y col., 1997) y rata (Dinh y col., 2002).

MAGL no hidroliza AEA, y se localiza en neuronas presinápticas (Gulyas y col., 2004); el 2-AG puede ser hidrolizado también por la serina-hidrolasa ABHD6 (Kano y col., 2009; Marrs y col., 2010) y por una nueva 2-AG lipasa recientemente identificada (Pamplona y Takahashi, 2011; Ueda y col., 2011). Este enzima se expresa principalmente en riñón, testículos, tejido adiposo, glándula adrenal y cerebro (Karlsson y col., 1997). En cerebro, los niveles más altos de MAGL, al igual que FAAH, se encuentran en aquellas regiones donde CB1 también es abundante, tales como hipocampo, corteza, tálamo anterior y cerebelo (Dinh y col., 2002; Gulyas y col., 2004).

La familia de inhibidores de MAGL contiene pocos miembros y la mayoría de ellos son poco selectivos. Los inhibidores de FAAH, como URB597 y OL-135, no producen una inhibición significativa de MAGL. Sin embargo, dos análogos de araquidonilglicerol, O-2203 y O-2204, son capaces de inhibir MAGL y FAAH, con una potencia similar y sin activar los receptores CB1 (rev. en Lambert y Fowler, 2005).

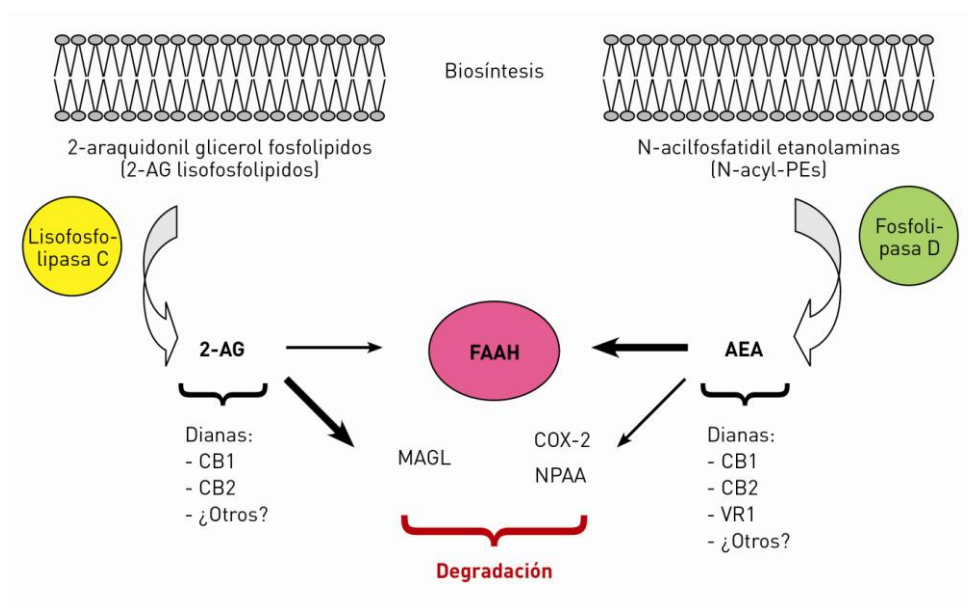


Figura 8. - Vías sintéticas y degradativas de los endocannabinoides AEA y 2-AG. La AEA tiene el mismo mecanismo de biosíntesis que el resto de las N-aciletanolaminas. Un enzima con actividad transacilasa dependiente de calcio cataliza la transferencia de un resto de ácido graso de un fosfolípido al grupo amino de la etanolamina, formando N-acilfosfatidiletanolamina; ésta sufre una hidrólisis por una fosfolipasa D (NAPE-PLD). El 2-AG se sintetiza a partir de fosfatidilinositol, que es sustrato de una fosfolipasa C, generando 1,2-diacylglicerol, y de éste, tras hidrólisis por una lipasa, se produce 2-AG. La degradación de la AEA implica principalmente el enzima FAAH, pero puede ser también sustrato de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y de NPAA, mientras que el 2-AG es degradado mayoritariamente por la lipasa MAGL.

Recientemente se ha observado que el enzima MAGL junto al enzima cPLA2 genera AA, substrato de prostaglandinas implicadas en la neuroinflamación como la PGE₂ y el tromboxano B2. La inactivación genética o farmacológica de MAGL provoca una reducción de estas prostaglandinas y un bloqueo casi completo del aumento de citoquinas proinflamatorias inducidos por LPS (Nomura y col., 2011).

6.4 Otros mecanismos de inactivación endocannabinoide

Algunos datos señalan que AEA y 2-AG, también pueden ser susceptibles a mecanismos oxidativos catalizados por varios tipos de oxigenasas. Estos enzimas están involucradas en la producción eicosanoide de ácido araquidónico e incluyen lipoxigenasas (LOX), ciclooxigenasas (COX) y oxidasas del citocromo P450 (Kozak y Marnett, 2002). La isoforma constitutiva de COX, COX-1, es menos efectiva que COX-2 metabolizando endocannabinoides (Kozak y col., 2003).

Sin embargo, la isoforma inducible, COX-2, oxigena AEA (Yu y col., 1997) y 2-AG (Kozak y col., 2000) proporcionando prostaglandina etanolamidas y prostaglandina glicerol ésteres, una clase nueva de prostaglandinas involucradas en la plasticidad sináptica del hipocampo (Yang y col., 2008). 2-AG también puede ser metabolizado por LOX-12 y LOX-15, pero no por el enzima LOX-5 (Kozak y col., 2002).

El derivado 15 hidro-peroxi, generado a partir de la oxigenación de 2-AG por LOX 15, puede actuar como ligando de los receptores nucleares PPAR α (Kozak y col., 2002) de modo que la oxigenación de 2-AG puede representar una ruta para la generación de agonistas de PPAR α . AEA también puede ser metabolizada por diferentes lipoxigenasas, y todos sus derivados oxigenados son buenos inhibidores de FAAH (van der Stelt y col., 2002).

El metabolismo oxidativo de AEA y 2-AG por los enzimas del citocromo P450 produce un grupo diverso de productos oxigenados, que incluye epóxidos e hidroxi-metabolitos (Snider y col., 2007).

Cabe la posibilidad de que la oxigenación de AEA y 2-AG, represente una fuente de nuevos mediadores, que posean actividades biológicas potentes y diferentes de las que presentan los endocannabinoides de los que proceden.

Sección 7

Antagonistas de receptores cannabinoides

El estudio de las acciones de los cannabinoides y en particular el desarrollo de antagonistas de receptores CB1 constituyó una herramienta fundamental en el estudio de la farmacología del sistema cannabinoide endógeno. El antagonista para el receptor cannabinoide CB1 más potente y mejor caracterizado hasta ahora es el Rimonabant (SR141716A) (Rinaldi-Carmona y col., 1994), retirado del mercado en 2009 por el riesgo asociado de trastornos psiquiátricos e ideas suicidas. A partir de la estructura del SR141716A, se han desarrollado otros antagonistas del receptor CB1 como el AM-251 (Gatley y col., 1996) y el AM-281 (Gatley y col., 1998), que también antagonizan de forma selectiva los efectos cannabimiméticos derivados de la activación de los receptores CB1.

Respecto al receptor CB2, la molécula más potente y mejor caracterizada como antagonista selectivo de este receptor es el SR141528 (Rinaldi-Carmona y col., 1998). Es importante resaltar que, a diferencia de lo que ocurre con la mayor parte de los agonistas, los antagonistas desarrollados hasta la fecha suelen ser selectivos de los diferentes tipos de receptor cannabinoide.

Otro hecho destacable es que muchos de los compuestos desarrollados como antagonistas de los receptores CB1 o CB2 son capaces, por sí solos, de provocar efectos contrarios a los evocados por agonistas cannabinoides. Este efecto se atribuyó inicialmente a un bloqueo del tono endógeno, aunque existe la posibilidad de que estos compuestos se comporten como agonistas inversos en algunos sistemas. Algunos estudios sugieren que los antagonistas de los receptores cannabinoides son capaces de disminuir la actividad constitutiva de estos receptores aunque el mecanismo por el que llevarían a cabo su acción es motivo de controversia (Meng y col., 2010).

Sección 8

Efectos y mecanismos neuroprotectores de los cannabinoides

Existen datos experimentales que demuestran que los cannabinoides tienen propiedades neuroprotectoras en diversas patologías neurodegenerativas tanto agudas (Marsicano y col., 2002; Mecholaum y col., 2002), como crónicas (Grundy y col., 2001; Grundy, 2002; Mecholaum y col., 2002; Fernández-Ruiz y González, 2005). En diversas situaciones patológicas existe una respuesta endógena al daño celular que se refleja en un incremento en los niveles de endocannabinoides (Hansen y col., 2001). Además, tanto los endocannabinoides como los agonistas sintéticos o naturales de los receptores cannabinoides, son capaces de activar vías de señalización encargadas de reparar el daño celular, atribuyéndose por tanto a estos compuestos un efecto neuroprotector (Van der Stelt y Di Marzo, 2005). En algunos casos, el efecto neuroprotector es causado por el bloqueo de receptores pero en la mayoría se debe a su estimulación (Bahr y col., 2006). Existen incluso compuestos cannabinoides como el CBD o el HU211, con afinidad muy baja para los receptores cannabinoides pero con capacidad neuroprotectora. El CBD, por ejemplo, es capaz de actuar como antioxidante y también de inhibir el transportador de AEA, de forma que su efecto neuroprotector podría estar asociado a un aumento de endocannabinoides. La anandamida ha mostrado un efecto protector en las neuronas expuestas a la proteína β -amiloide a través de una vía independiente de los receptores cannabinoides (Harvey y col., 2012). El HU-211, por otro lado, es un antagonista de receptores NMDA de glutamato y tiene también propiedades antioxidantes. Por lo tanto, existen varios mecanismos por los cuales los cannabinoides son capaces de producir neuroprotección (Grotenhermen, 2004). En la última década, han aparecido un gran número trabajos que evidencian que el sistema endocannabinoide podría ser un mecanismo de protección endógeno frente a procesos citotóxicos, inflamatorios, oxidativos y otros que puedan producir daño cerebral.

Los mecanismos moleculares que están implicados en las propiedades neuroprotectoras de los cannabinoides son muy diversos, y frecuentemente, complementarios.

8.1 Efecto antiglutamatergico

La excitotoxicidad, reflejada por unos niveles extracelulares excesivos de glutamato e hiperactivación de sus receptores, principalmente los de tipo NMDA, es uno de los eventos críticos en los procesos de neurodegeneración tanto agudos como crónicos. Varios experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado que los cannabinoides previenen la muerte neuronal por excitotoxicidad (Hampson y col., 1998; Marsicano y col., 2003; Katona y Freund, 2008), al disminuir la liberación de glutamato a través de un efecto neuronal ejercido a nivel presináptico.

8.2 Disminución del flujo intracelular de calcio

El aumento rápido y masivo de la concentración de calcio intracelular es uno de los elementos clave del proceso de daño neuronal en procesos de degeneración crónica. Este aumento participa en la despolarización de la membrana neuronal y mitocondrial, con el consiguiente fracaso funcional de ambas, potencia el estrés oxidativo e inicia la vía de muerte neuronal programada o apoptosis. Los agonistas cannabinoides, actuando sobre los receptores CB1 localizados en las neuronas postsinápticas, pueden bloquear los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje evitando así la activación de diversas cascadas intracelulares de Ca^{2+} con capacidad de producir daño neuronal (Shen y col., 1998; Fowler, 2003).

8.3 Propiedades antioxidantes

Algunos cannabinoides proporcionan neuroprotección porque son capaces de restaurar el balance normal entre el daño oxidativo y los mecanismos antioxidantes endógenos que resulta descompensado en muchas enfermedades neurodegenerativas (por una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno, por una deficiencia en los mecanismos antioxidantes endógenos o por ambas causas) (Marsicano y col., 2002). Entre los compuestos que tienen esta capacidad se encuentran los fitocannabinoides CBD, Δ^9 -THC y cannabinol o sus análogos nabilona, levonantradol y dexanabinol. Los cannabinoides confieren protección contra el estrés oxidativo reduciendo la producción de NO en macrófagos y microglía (Mestre y col., 2005) y astrocitos (Molina-Holgado y col., 2002).

Parece bien demostrado que éste es un efecto independiente de receptor (Marsicano y col., 2002) que está basado en la acción de estos compuestos como limpiadores de especie reactivas de oxígeno debido a la particular estructura química de los cannabinoides antioxidantes, que contiene grupos fenólicos (Marsicano y col., 2002). Sin embargo, se han propuesto mecanismos adicionales que implican una estimulación directa de los enzimas antioxidantes (Sagredo y col., 2007).

8.4 Control del sistema vascular

Los agonistas cannabinoides pueden también reducir la degeneración neuronal mejorando el flujo sanguíneo en el cerebro dañado, un efecto particularmente interesante en el caso de los episodios isquémicos. Este efecto vasodilatador podría llevarse a cabo mediante la inhibición de la producción de varios mediadores derivados de la endotelina, como la endotelina-1 o el NO[•], que están asociados con la vasoconstricción típica de los episodios isquémicos. Este efecto podría estar mediado por el receptor CB1 (Wagner y col., 1998; Chen y col., 2000; Randall y col., 2002), aunque se han propuesto nuevos tipos de receptores para los efectos cardiovasculares de los cannabinoides (Begg y col., 2005) como el “receptor cannabinoide endotelial”, que estaría implicado en la vasodilatación producida por la virodamina (Kozłowska y col., 2008).

8.5 Efecto antiinflamatorio

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC y mantienen una relación muy estrecha con las neuronas, asistiéndolas desde un punto de vista metabólico y también en su habilidad de comunicarse unas con otras. Bajo condiciones patológicas, los astrocitos liberan citocinas encargadas de controlar la amplitud de la respuesta neuroinflamatoria mediada por la microglía reclutada y activada por la lesión. Algunos agonistas cannabinoides también se comportan como moléculas antiinflamatorias capaces de reducir los procesos inflamatorios que, frecuentemente, acompañan a enfermedades neurodegenerativas y se ha visto que están relacionadas con la activación de células gliales en zonas de lesión. Existen varios estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que sugieren que los cannabinoides afectan a la neuroinflamación (Stella 2004; Walter y Stella, 2004).

En un estudio reciente se ha demostrado que la inhibición de FAAH inhibe la expresión de IL-1 β en hipotálamo inducida por LPS (Kerr y col., 2011). Los receptores CB1 median la inhibición inducida por anandamida de las moléculas de expresión VCAM-1 en cultivos de células endoteliales cerebrales (Mestre y col., 2011).

Existen receptores cannabinoides CB2 en células gliales, especialmente en las células de microglía reactiva y la activación de dichos receptores incide sobre el control de funciones específicas de estas células cuyo propósito es regular la homeostasis neuronal. El receptor CB2 está también asociado a neurogénesis, y está ampliamente expresado en progenitores neuronales que proliferan *in vitro* and *in vivo* estimulados por agonistas CB2 (Palazuelos y col., 2006). A través de estos receptores, los cannabinoides pueden reducir el impacto de las citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α) (Molina-Holgado y col., 2007) así como el de NO y NF- κ B (Espósito y col., 2006; Juttler y col., 2004). Por otro lado, la activación del receptor CB2 también podría aumentar la producción de moléculas pro-supervivencia como ciertas citocinas antiinflamatorias. Además, los cannabinoides podrían mejorar el aporte trófico de los astrocitos hacia las neuronas (Guzmán y Sánchez, 1999), un efecto que es probablemente mediado por la activación de receptores CB1, aunque no se puede descartar un papel adicional del receptor CB2 (Fernández-Ruiz y col., 2007).

Efectos beneficiosos de agonistas CB2 han sido demostrados en modelos animales de daño cerebral focal (oclusión de arteria cerebral media y lesiones cerebelares) (Zhang y col., 2007; Zhang y col., 2009) lesión de médula espinal (Baty y col., 2008; Adhikary y col., 2011), enfermedad de Huntington (Sagredo y col., 2009) y enfermedad de Parkinson (Price y col., 2009).

Sección 9

Cannabinoides y estrés

La neuroinflamación incontrolada contribuye a la muerte y daño celular en las enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas, incluidas las especialmente relacionadas a exposición a estrés (depresión, trastorno por estrés post-traumático) (rev. en McLeod y col., 2001). Datos previos de modelos de estrés (físico, psicológico o mixto) muestran una consistente respuesta inflamatoria en el cerebro que se caracteriza por una compleja liberación de diferentes mediadores inflamatorios (rev. en García-Bueno y col., 2008). La exposición a estrés provoca excitotoxicidad debido a la masiva liberación del aminoácido excitador glutamato en algunas áreas cerebrales, que induce la liberación de citocinas proinflamatorias como el TNF- α o la IL-1 β , que activa la vía del NF- κ B, que a su vez regula la actividad de enzimas proinflamatorias como la NOS-2 y la COX-2. El resultado de esta secuencia de efectos es la acumulación de mediadores oxidativos y nitrosativos, que pueden causar daño de la membrana y muerte celular, en un proceso conocido como peroxidación lipídica.

Sin embargo, a pesar de la sobreacumulación de mediadores oxidativos/nitrosativos como el NO, el ONOO⁻ o la PGE₂ inducida por estrés, algunos autores han reseñado la posibilidad que alguno de los múltiples cambios provocados por los efectores de la respuesta a estrés no tengan consecuencias deletéreas sobre la supervivencia neuronal sino predominantemente beneficiosas para su estructura y función, al aumentar la plasticidad adaptativa (McEwen, 1998).

Actualmente, uno de los mecanismos que está suscitando mayor interés en el ámbito científico como posible vía neuroprotectiva es el desarrollado por ciertos mediadores lipídicos derivados de la activación de las distintas isoformas COXs, como la 15d-PGJ₂ y su receptor nuclear PPAR γ . Esta vía derivada de la COXs se activa en el cerebro en respuesta al estrés o a otros estímulos neuroinflamatorios, constituyendo un posible mecanismo antiinflamatorio de defensa contra la excesiva inflamación (García-Bueno y col., 2005).

El estudio de vías antiinflamatorias alternativas/correlacionadas merece especial atención para entender las alteraciones pato-fisiológicas inflamatorias así como nuevas dianas terapéuticas para las neuro-psicopatológicas relacionadas a estrés.

El sistema endocannabinoide ha sido propuesto como un sistema endógeno homeostático activado por diferentes estímulos inmunes para restablecer el equilibrio en el cerebro a diferentes niveles. En un contexto relacionado al estrés, ciertos estudios epidemiológicos han demostrado que los cannabinoides afectan a la ansiedad y la respuesta al estrés (Rev. in Cota, 2008; Wilson y Cadet, 2009; Hill y col., 2010) y que individuos con diagnosis de depresión mayor presentan niveles reducidos de endocannabinoides circulantes (Miller y col. 2008; Hill y col., 2009). La presencia del sistema endocannabinoide en los circuitos neuronales involucrados en la respuesta a estrés sugiere que puede jugar un papel importante en la regulación neuroendocrina, neuroinflamatoria y en las respuestas comportamentales al estrés. Una desregulación farmacológica o genética del sistema endocannabinoide produce un estado fenotípico que reproduce los cambios provocados por la exposición a estrés crónico, como una aumentada emocionalidad (Aso y col. 2008; Thiemann y col. 2009; Beyer y col. 2010), una exagerada respuesta al estrés (Steiner y col., 2008) y una reducción de la plasticidad hipocampal y de la resistencia celular (Lee y col., 2009; Beyer y col., 2010). Está demostrado que la modulación de los efectos neuroinflamatorios y neuroendocrino-comportamentales ocurre a través de los receptores CB1 y CB2, respectivamente. La ausencia del receptor CB1 altera la actividad del eje HHA y la plasticidad neuronal que probablemente contribuyen al desarrollo de trastornos emocionales (Berton y Nestler, 2006). La estimulación farmacológica de la actividad de los EC a nivel del receptor CB1 provoca efectos antidepresivos en modelos animales de depresión, como en estrés subagudo y ha sido demostrado que protege las neuronas frente a daño cerebral agudo, manifestando un sorprendente potencial como alternativa terapéutica en caso de patologías neuroinflamatorias y excitotóxicas del SNC (Galve-Roperh y col., 2008).

Un estudio ha demostrado que el tratamiento crónico con Rimonabant induce un aumento de la concentración de citoquinas proinflamatorias como el IFN γ y TNF- α y estos ratones presentan un fenotipo depresivo (Beyer y col., 2010).

Además estudios recientes muestran que también el receptor CB2 tiene un papel en la regulación de la ansiedad y depresión: ratones KO por el receptor CB2 presentan una vulnerabilidad aumentada frente a estímulos estresantes (Ortega-Álvarez y col., 2011; Arnold y col., 2012) y ratones transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 presentan cambios en la funcionalidad del eje HHA y mayor resistencia frente a estímulos estresantes agudos y crónicos en diferentes tests comportamentales, además de comportamientos depresivos disminuidos (García-Gutiérrez y Manzanares, 2011).

Sección 10

Antecedentes inmediatos

Durante la última década y desde el inicio de esta Tesis Doctoral numerosos estudios han evidenciado que el SEC es capaz de regular la respuesta a estrés (Marsicano y col., 2002; Patel y col., 2005; Ganon-Elazar y Akirav, 2009; Rev. en Lutz, 2009; Hill y col., 2009; Abush y Akirav, 2010; Akirav, 2011; Häring y col., 2012). Hasta la fecha, se ha visto que el SEC controla la liberación de neurotransmisores en diferentes poblaciones neuronales (ej. GABA, glutamato, catecolaminas y monoaminas) sugiriendo un mecanismo general de regulación de las respuestas emocionales y al estrés. El receptor CB1 se encuentra ampliamente distribuido en el SNC y está presente además en las principales estructuras cerebrales involucradas en la respuesta a estrés, sobre todo a nivel de neuronas glutamatérgicas y gabérgicas (Häring y col., 2012). Hay evidencia de que el estrés y el SEC están estrictamente interrelacionados. Han sido descritos tanto cambios en la señal endocannabinoide tras estrés como también cambios en la respuesta al estrés tras una modulación del SEC. De este modo, el estrés agudo induce efectos a corto plazo en la señalización endocannabinoide, como un cambio del contenido de endocannabinoides en la amígdala y corteza prefrontal (Patel y col., 2005; Hill y col., 2009, 2011) y la activación de los receptores cannabinoides previene los efectos del estrés sobre la función del eje HHA (Ganon-Elazar y Akirav, 2011).

El estrés persistente constituye un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neuropsiquiátricas y modelos de estrés en roedores ofrecen una línea de investigación atractiva sobre este tema (Holsboer y Ising, 2010). Utilizando dichos modelos han sido observados cambios en la señalización del SEC, basados en cambios en la expresión de los receptores cannabinoides y/o de los enzimas que sintetizan y degradan EC. Las modificaciones farmacológicas del SEC pueden revelar la relación entre la actividad del SEC y las respuestas moleculares y comportamentales al estrés.

La delección genética global del receptor CB1 incrementa la actividad del eje HHA, reproduciendo los efectos de un tratamiento con un antagonista.

Los ratones CB1 KO tienen niveles elevados de CRH mRNA en el PVN, que indica una aumentada activación del eje HHA (Cota y col., 2003, 2007; Steiner y col., 2008a) y un empeoramiento del mecanismo de feedback inhibitorio (Cota, 2008; Steiner y Wotjak, 2008; Hill y col., 2010b). La administración intra-amígdala basolateral de WIN provoca una reducción de la respuesta glucocorticoide al estrés (Ganon-Elazar y Akirav, 2009). Otros estudios han descrito el efecto del bloqueo o de la sobreexpresión de diferentes componentes del SEC. El bloqueo farmacológico de la degradación de endocannabinoides provoca los efectos beneficiosos de los agonistas cannabinoides directos, pero al mismo tiempo reduce los efectos no deseados (Petrosino and Di Marzo, 2010). La delección de FAAH provoca efectos ansiolíticos y antidepresivos (Moreira y col., 2008; Bambico y col., 2010) y el bloqueo del receptor CB2 induce una respuesta ansiolítica (Onaivi y col., 2008).

Una adecuada respuesta emocional al estrés es esencial para la supervivencia y requiere una regulación fina de distintos circuitos neuronales necesarios para prevenir desequilibrios comportamentales. En resumen, hay evidencias de que una modulación del SEC puede afectar la respuesta a estrés a distintos niveles.

PARTE II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Estudios anteriores han demostrado cómo la exposición a estrés provoca excitotoxicidad debido a la masiva liberación del aminoácido excitador glutamato en algunas áreas cerebrales como la corteza prefrontal. Esto induce la liberación de mediadores proinflamatorios que pueden, en última instancia, provocar cambios reversibles y/o irreversibles en la función y estructura de determinadas áreas cerebrales (Lee y col., 2002).

Paralelamente, han aparecido en la literatura científica interesantes estudios sobre las posibles acciones neuroprotectoras de los cannabinoides en modelos animales de enfermedades neurológicas/neurodegenerativas (Ganon-Elazar y Akirav, 2011).

A partir de estos antecedentes nos planteamos la siguiente hipótesis:

“La estimulación farmacológica de los receptores CB1 Y CB2 produce efectos antiexcitotóxicos y/o antiinflamatorios en el cerebro de ratones sometidos a un modelo de estrés y su bloqueo los agrava.”

Objetivos

Para demostrar nuestra hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos en un modelo animal de estrés por inmovilización/acústico:

1. Estudiar la activación de los receptores CB1 y CB2 durante el estrés y los posibles mecanismos implicados.
2. Evaluar los efectos del tratamiento con agonistas CB1 (ACEA) y CB2 (JWH-133) sobre el proceso de excitotoxicidad glutamatérgica que acontece tras exposición a estrés por inmovilización y dilucidar los posibles mecanismos implicados.
3. Analizar los efectos de los tratamientos con agonistas CB1 (ACEA) y CB2 (JWH 133) sobre el proceso neuroinflamatorio inducido por estrés por inmovilización y dilucidar los posibles mecanismos implicados.
4. Estudiar el proceso excitotóxico/neuroinflamatorio inducido por la exposición a estrés en ratones KO para los receptores CB1 y CB2 y en ratones modificados genéticamente que sobre-expresen el receptor CB2 y dilucidar los posibles mecanismos implicados.
5. Analizar los efectos de la exposición a estrés repetido sobre los niveles de los principales endocannabinoides y sobre sus enzimas de síntesis y degradación en corteza prefrontal.

PARTE III

MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se describen los protocolos que se han llevado a cabo durante la realización de esta Tesis doctoral. En primer lugar se describe el protocolo de estrés al que se sometieron a los animales. A continuación, se explican el conjunto de técnicas empleadas para la obtención de resultados.

Todos los protocolos experimentales se realizaron según la normativa estipulada por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense conforme a la regulación Europea y Española (2003/65/EC).

Se adjunta una copia del diploma de la “Acreditación para la utilización de animales en experimentación: categoría B” de la autora de la Tesis.



LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

expide a

D^a. SILVIA ZOPPI

el presente

CERTIFICADO DE FORMACIÓN CONTINUA

por haber superado satisfactoriamente el curso:

**“ACREDITACIÓN PARA LA UTILIZACIÓN DE ANIMALES
EN EXPERIMENTACIÓN: CATEGORÍA B”**

referenciado como Curso Certificado de Formación Continua, celebrado en
Madrid, del 20 al 24 de abril de 2009

Manuel Rodríguez Sánchez
Vicerrector de Doctorado y
Titulaciones Propias



Sección 1

Modelo experimental

1.1 Animales

En el modelo de estrés subagudo los animales utilizados fueron ratones macho adultos jóvenes ICR doble mutante CB1 (-/-) y CB2 (-/-), transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 (CB2+), controles (WT) y ratones C57B16 de un peso aproximado de 30 g.

Los animales que sobreexpresan el receptor CB2 y los *knock-out* respectivos para los receptores CB1 y CB2 fueron cedidos por el Dr. Jorge Manzanares (Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Alicante).

Los ratones CB1 *knock-out* fueron obtenidos a través de la recombinación genética (Ledent y col., 1997). El gen CB1 fue clonado de una biblioteca genómica de ratón 129/Sv y el exón codificante fue mapeado y secuenciado (EMBL/GenBank Y18374). Un cassette PGK-Neo fue insertado entre los sitios Avr II y Sfi I, remplazando los primeros 233 codones del gen. Fue realizada una recombinación homóloga en células R y una agregación en embriones al estadio de 8 células.

Para generar quimeras fue utilizada una línea recombinante permitiendo la transmisión del gen mutado. Con el fin de igualar los fondos genéticos, los animales heterocigotos se cruzaron sucesivamente, y a partir de la sexta generación los animales CB1 KO se utilizaron para este estudio.

Los ratones que sobreexpresan el receptor CB2 fueron generados utilizando el Open Reading Frame (ORF) del receptor CB2 (Racz y col., 2008b). El ORF fue aislado mediante amplificación por PCR de ARNm de cerebro de ratón, utilizando primers que crearon un punto de restricción del enzima XhoI adyacente a los sitios traslacionales de comienzo y fin. Para la producción de los ratones transgénicos se utilizó el vector MoPrP.Xho (Watkins y col., 2003). El ORF del receptor CB2 fue clonado en el exon 2 del constructo MoPrP.Xho (Watkins y col., 2003).

El transgen PrP-CB2 fue extraído del plásmido vector mediante la restricción de la endonucleasa NotI, produciendo fragmentos de ADN de 12 kb. Los transgénicos fundadores fueron cruzados con ratones no consanguíneos CD-1 por 7 generaciones. La presencia del transgen fue determinada por PCR utilizando primers específicos contra el exon 2 de PrP (5'-CCAGCCTCCACCACCATGTGGC) y el receptor CB2 (5'-AGCCACCGTTGGAGCCGTTG).

Los ratones CB2 *knock-out* fueron generados según el método descrito por Buckley y col., (2000). El vector diana se obtuvo a partir del plásmido pPNT (Tybulewicz y col., 1991) introduciendo el gen de la neomicina. Mediante recombinación homóloga, el gen de 341 bp del receptor CB2 fue sustituido con el gen de la neomicina. Los ratones quiméricos fueron generados mediante agregación de una inyección en la blastocitosis de la mórula con la línea celular embrional 129. Los animales quimeras fueron cruzados con ratones C57BL/6. El genotipo de la generación F2 para identificar los ratones KO para el receptor CB2 fue obtenido mediante hibridación Southern blot y PCR del ADN de las colas (Buckley y col., 2000).

Los animales fueron ubicados en jaulas bajo condiciones estándar de temperatura y humedad en ciclo luz/oscuridad de 12 horas (encendido de luces: 08:00) con acceso a comida y agua *ad libitum*. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones constantes los 4 días anteriores al comienzo del estrés.

1.2 Estrés por inmovilización

Los correspondientes grupos de ratones fueron expuestos conjuntamente a inmovilización subcrónica y a estrés acústico utilizando un baño de ultrasonidos (2 horas de 13.00h a 15.00h durante 4 días). La inmovilización de los ratones se realizó con un cono de plástico que se ajusta al cuerpo del animal impidiendo su movimiento pero sin alterar su respiración (tipo Corning ® de 50mL con agujeros de ventilación)(Figura 8). Los animales del grupo control no fueron estresados, únicamente fueron manipulados a las 13:00 por el mismo experimentador (sacar y volver a introducir al animal en su jaula).

1.3 Justificación del modelo

El método utilizado es el estrés por inmovilización/acústico, clasificado como mixto físico y psicológico, predecible e inescapable, apto para estudiar los efectos neuroquímicos del estrés sobre las funciones cerebrales (Kiank y col., 2006; Depke y col., 2008; Olfe y col., 2010). La elección de este modelo se debe a múltiples razones: los métodos de inducción de estrés físico inescapable son los más frecuentemente utilizados (ayuno, natación forzada, ejercicio en rota-rod, etc.). El protocolo elegido es más fácilmente interpretable que otros como el estrés social por hacinamiento, aislamiento o lucha (Sheridan y col., 2004; Buynitsky y Mostofsky, 2009).

El Centro Nacional para el estudio del síndrome de PTSD de EEUU recomienda la realización del estrés por inmovilización como modelo más útil y ajustado para el estudio del PTSD, depresión y procesos neurodegenerativos relacionados en humanos (Telner y col., 1984; Bremner y col., 1997). La reproducibilidad de este modelo es relativamente fácil, y puede repetirse en protocolos de estrés crónico (Poland y col., 1999). La mayoría de los estudios sobre el estrés utilizan este modelo, incluido los estudios precedentes realizados en este grupo de investigación, de modo que es del que se tienen más datos científicos. El estrés inducido por inmovilización provoca cambios psicológicos y físicos que causan una amplia gama de alteraciones comportamentales y fisiológicas (Rev. en McEwen, 2000; Kim y col., 2006). La exposición a estímulos estresantes como la inmovilización ha sido utilizada como modelo animal de depresión (Armario y col., 1991; Hayase y col., 2000). Se han evaluado los modelos de estrés acústico y por inmovilización por separado o a la vez y se ha concluido que hay mayor y más predecible respuesta cuando se utilizan en combinación (Qiu y col., 1999).

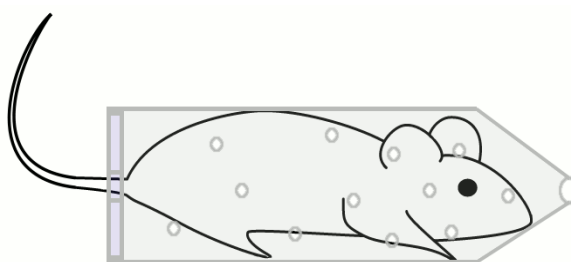


Figura 8. - Esquema del cono de inmovilización

El estrés acústico fue inducido por un aparato a emisión randomizada de ultrasonidos (19 y 25 kHz con picos de 0–35 dB) (UD200SH-6L, Sonitech) impidiendo la adaptación del animal al estrés (Kiank y col., 2006).

Sección 2

Obtención de muestras, métodos y estadística

Los animales se sacrificaron por administración de una dosis letal de pentobarbital sódico (2.5ml/kg). A continuación, se extrajo sangre mediante punción cardiaca con citrato trisódico para evitar su coagulación (3.15% w:v 1 vol. de citrato por 9 vol. de sangre). Se separó el plasma por centrifugación (1500 rpm 10min) para su posterior análisis.

Después de la decapitación, se extrajo el cerebro del cráneo, se limpiaron las meninges y los vasos y se aislaron las áreas corticales de interés que se congelaron rápidamente en hielo seco y se guardaron a -80°C hasta su posterior utilización.

La corteza prefrontal fue elegida por la presencia de niveles elevados del receptor CB1, mediadores proinflamatorios (NOS-2, PGE₂) y antiinflamatorios (PPAR γ) y por su susceptibilidad al daño excitotóxico provocado por estímulos inflamatorios/inmunes (García-Bueno y col., 2008b). Además es una área neuronal fundamental en la regulación de la respuesta HHA al estrés por inmovilización (Radley y col., 2006).

2.1 Herramientas farmacológicas

A los correspondientes grupos de animales les fue inyectado por vía intraperitoneal (i.p.) y diariamente el potente y selectivo agonista del receptor CB1 ACEA (Arachidonyl-2'-chloroethylamide)(K_i = 1.4 nM)(Figura 9) a una dosis de 2.5 mg/kg o su vehículo (una solución de etanol 5%, dextrosa 5% y Tween80 en salino estéril). A otros grupos les fue inyectado el agonista del receptor CB2 JWH133 ((6aR,10aR)-3-(1,1-Dimetilbutil)-6a,7,10,10a-tetrahidro-6,6,9-trimetil-6H dibenzo pirano)(K_i = 3.4 nM)(Figura 9) a una dosis de 2.0 mg/kg o su vehículo (una solución de salino estéril, Tween80 y DMSO (Dimetilsulfóxido) en proporción 18:1:1).

Las dosis fueron seleccionadas sobre la base de estudios previos realizados con dichos fármacos (Arévalo-Martín y col., 2003; Zarruk y col., 2012) y en base a la afinidad de estos agonistas hacia los receptores cannabinoides; (ACEA >1400-veces CB1 selectivo vs. CB2; JWH-133 >200-veces CB2 selectivo vs. CB1) (Pertwee, 1999).

Farmaco	Mecanismo de acción	Dosis utilizada
MK-801	Antagonista NMDA	0.1 mg/kg
ACEA	Agonista CB1	2.5 mg/kg
JWH-133	Agonista CB2	2.0 mg/kg

Tabla 1. - Tabla de herramientas farmacológicas.

Para bloquear los efectos derivados de la activación del receptor de glutamato NMDA a dos grupos de animales se les administró un antagonista NMDA específico no competitivo NMDA: MK-801 [(+)-5-metil-10,11-diidrox-5H-dibenzo (a,d) cyclohepten-5,10-imine; MK], (MK-801; 0.1 mg/kg). Esta dosis fue elegida para evitar posibles efectos neurotóxicos, alucinógenos y disruptores del eje HHA (García-Bueno y col., 2008b; Wong y col., 1998; Jezova y col., 1995). ACEA, JWH-133 y su vehículo fueron inyectados al comienzo del estrés y MK-801 una hora antes (Tabla 1).

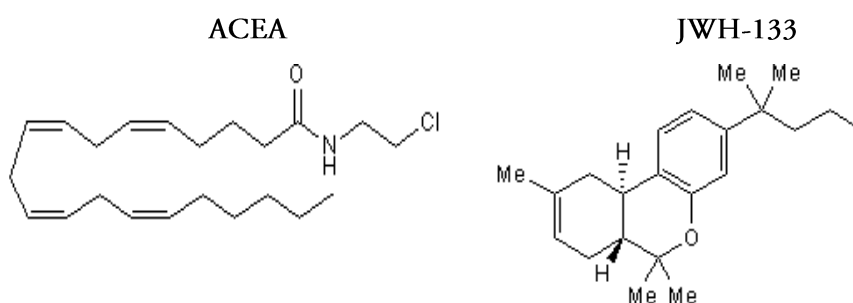


Figura 9. - Estructura química de los agonistas cannabinoides CB1 (ACEA) y CB2 (JWH-133).

Ningún parámetro estudiado se modificó en los dos grupos tratados con el vehículo y para simplificar las figuras, ambos grupos fueron unificados en un único grupo tratado con vehículo: (CWT) en el caso del grupo control y (SWT) en el caso del grupo estrés. Cada grupo experimental incluyó al menos 6 animales (n=6).

2.2 Obtención de extractos nuclear y citosólico de muestras de tejido cerebral

Mediante el método de Schreiber y col. (1989) con algunas modificaciones. Se aislaron las muestras de corteza cerebral e inmediatamente se homogeneizó el tejido en 300 μ L de tampón (10 mmol/L N-2-hydroxietilpiperazina-N'-2-etanesulfonic acid, pH 7.9; 1 mmol/L etilenediamina tetra-acetic acid (EDTA), 1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L dithiothreitol (DTT), 0.5 mmol/L fenilmetilsulfonil fluoride, 0.1 μ g/mL aprotinina, 1 μ g/mL leupeptina, 1 μ g/mL N α -p-tosyl-L-lysina-chlorometilcetone, 5 mmol/L NaF, 1 mmol/L NaVO₄, 0.5 mol/L sacarosa, y 10 mmol/L Na₂MoO₄). Después de 15 minutos en hielo, se añadió el detergente Nonidet P-40 (Roche) a una concentración de 0.5%. Los tubos fueron cuidadosamente volteados durante 15 segundos y se obtuvieron los núcleos mediante centrifugación a 8000g durante 5 minutos. Se separaron los sobrenadantes como fracción citosólica. Los "pellets" nucleares restantes fueron resuspendidos en 100 μ L de tampón suplementado con 20% glicerol KCl 0.4 mol/L y se agitaron lentamente durante 30 minutos a 4°C. Los extractos de proteína nuclear fueron obtenidos tras centrifugación a 13000g durante 5 minutos, alicuotados y conservados a -80°C. Todos los pasos del proceso del fraccionamiento se llevaron a cabo a 4°C.

2.3 Análisis por Western Blot

Con el objetivo de determinar parámetros inflamatorios/oxidativos se realizaron análisis de la expresión de las proteínas CB1, CB2, EAAT2, NF- κ B (p65), I κ B α , NOS-2, COX-2, L-PGDS y PPAR γ por Western Blot (Tabla 2).

Después de determinar y ajustar su contenido proteico, los homogenados de las diferentes muestras, después de ser centrifugados (12.000g, 5 minutos a 4°C) se mezclaron con Laemmli® (Biorad) con β -mercaptoetanol al 5% hasta doblar el volumen original, con una concentración final de 1 μ g/ μ l. Se cargaron entre 10 y 15 μ g dependiendo de la proteína a determinar en un gel de electroforesis de SDS (Dodecil sulfato sódico)-poliacrilamida a un porcentaje variable según el peso molecular de la proteína estudiada. Las proteínas se separaron por electroforesis a 100 voltios. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante una transferencia semi-seca (bio Rad Trans-blot. SD, semi-dry transfer cell) durante 30-45 minutos en función del peso molecular. Después, las membranas fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina sólida al 5% durante 90min a temperatura ambiente y fueron incubadas 12 horas a 4°C con los respectivos anticuerpos primarios. Al día siguiente se lavaron durante 30 minutos con TBST (Solución de Tris (Hidroximetil aminometano) tamponada con Tween 20 al 0.1%) y se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios durante 90min y se volvieron a lavar otros 30 minutos. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos fueron reveladas mediante un kit ECL® de quimioluminiscencia (Amersham) y visualizadas en películas de rayos X.

Las autorradiografías se cuantificaron mediante densitometría de las bandas (programa Image J). Como control de carga se utilizó la proteína β -actina.

2.4 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (Q-PCR)

Se extrajo el ARN de homogenados de cerebro mediante la técnica del Trizol[®] (Invitrogen). Se analizó la cantidad y la calidad del ARN obtenido mediante absorbancia 260/280nm con un espectrofotómetro “Nanodrop[®]”. El ARN se transformó a ADNc usando hexámeros de *primers* aleatorios y retrotranscriptasa (Invitrogen).

Los cambios cuantitativos de los niveles de ARNm se estimaron por Q-PCR en las siguientes condiciones: 35 ciclos que constan de: desnaturalización, 10s a 95°C, alineación, 15s a 58-61°C, según los *primers* utilizados (Tabla 3), y extensión, 20s a 72°C. La reacción se llevó a cabo en presencia del fluorocromo SYBR *green* presente en master mix comercial (Biotools). Las PCRs se realizaron en una Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia). Las cantidades relativas de ARNm se calcularon según el punto de despegue de la reacción (*take-off*) usando el software propio de la máquina y los niveles fueron normalizados por tubulina.

Proteína (Pm)	Tipo de Muestra	Anticuerpo Primario (dilución)	Anticuerpo Secundario (dilución)	% Acrilamida
PPAR γ (57)	Homogenados corteza	S.Cruz Anti-Mouse (1:1000)	Amersham (1:2000)	10%
CB1 (60)	Homogenados corteza	Abcam Anti-Rabbit (1:1000)	S.Cruz (1:2000)	10%
CB2 (45)	Homogenados corteza	S.Cruz Anti-Goat (1:1000)	Sigma (1:10000)	10%
NOS-2 (130)	Homogenados corteza	S.Cruz Anti-Rabbit (1:1000)	S.Cruz (1:2000)	7%
I κ B α (36)	Extracto citoplasma	S.Cruz Anti-Rabbit (1:1000)	S.Cruz (1:2000)	10%
L-PGDS (23)	Homogenados corteza	Cayman Anti- Rabbit (1:500)	S.Cruz (1:2000)	12%
EAAT-2 (62)	Homogenados corteza	S.Cruz Anti-Rabbit (1:1000)	S.Cruz (1:2000)	10%
COX-2 (73)	Homogenados corteza	S.Cruz Anti-Rabbit (1:1000)	S.Cruz (1:2000)	10%
NF- κ B (65)	Extracto nuclear	S.Cruz Anti-Rabbit (1:1000)	S.Cruz (1:2000)	10%

Tabla 2 - Resumen de las proteínas detectadas por Western Blot y las condiciones empleadas.

2.5 Preparación de sinaptosomas

Tras la toma de muestras, se diseccionó la mitad del cerebro anterior en hielo. Los siguientes pasos fueron realizados a 4° grados. El tejido fue inmediatamente homogeneizado en 25 volúmenes de sacarosa 0.32M en un homogeneizador teflón-vidrio. El homogeneizado fue centrifugado a 20000 g durante 10 minutos, se descartó el “pellet” y el sobrenadante fue posteriormente centrifugado a 20000 g durante 20 minutos. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en sacarosa 0.32M.

2.6 Cuantificación del transporte de glutamato: recaptación sinaptosomal de [³H] glutamato

La recaptación sodio-dependente de glutamato en sinaptosomas se midió siguiendo el método descrito por Robinson y col. (1991) con algunas modificaciones. Se mezclaron 25µl de sinaptosomas con 250 µl de tampón de incubación (5mM Tris, 10mM HEPES (Ácido 2-(4-(2-Hidroxiethyl)-1-piperacil) etanesulfónico), 2.5mM KCl, 1.4M NaCl, 1.2mM CaCl₂, 1.2mM MgCl₂, 1.2mM KH₂PO₄, y 10mM dextrosa, pH 7.4) suplementado con L-[³H] glutamato 0.125 mM (1mCi/ml; Amersham Biosciences Europe GmbH, Friburg, Germany) durante 3 minutos a 37°C en un baño de agitación. La recaptación se paró al

Secuencia Genes	Primers	Secuencia Primers
CB1	sense antisense	AACTGTGCCAGGCAATCTGTTGTG GGCCTTCCCATTGAAGCACAAACT
CB2	sense antisense	TGAAGATCGGCAGTGTGACCATGA AATGCTGAGAGGACCCACATGACA
TNF-α	sense antisense	TCTCATGCACCACCATCAAGGACT ACCACTCTCCCTTTGCAGAACTCA
MCP-1	sense antisense	AGCAGGTGTCCCAAAGAAGCTGTA AAAGGTGCTGAAGACCTTAGGGCA
NAPE-PLD	sense antisense	TGCTGTCCTCATCAGTCACAACCA GTTCTCGCAGCCACATTTCTGCAT
MAGL	sense antisense	CAGAGAGGCCAACCTACTTTTC ATGCGCCCCAAGGTCATATTT
FAAH	sense antisense	TGGAGTCGACTTAAACGCTGCTGA TCTGGCAAACAGTAGGCACTCGAT
DAGL-α	sense antisense	CGACCACCAAGTGCAACCATTGAA TGGAGAGTGTGGATCCCAAGCAAT

Tabla 3 - *Primers* utilizados en la PCR a tiempo real.

añadir 1 ml de tampón de colina fresco (igual composición que el cóctel de incubación pero sustituyendo NaCl por colina). Las muestras fueron centrifugadas a 10.000g durante 2 minutos para recuperar la fracción sinaptosomal. Se midió la radioactividad del ^3H utilizando un contador de líquido de centelleo gamma (Perkin Elmer).

2.7 Niveles de corticosterona plasmática

Se midieron los niveles de corticosterona plasmática utilizando un kit de radioinmunoensayo comercial para corticosterona de rata marcada radiactivamente con el isótopo I^{125} (Coat-a-count[®] corticosterone kit, Siemens medical solutions diagnostics, Los Angeles, CA). La radiactividad resultante en las muestras se midió en un contador de centelleo gamma durante un minuto (Perkin Elmer). Los valores de concentración plasmática de corticosterona en animales control coincidieron con los esperados para ratones adultos a las 15:00 horas (hora de extracción de la sangre).

2.8 Cuantificación de MCP-1 (Proteína quimioatrayente de monocitos)

Se cuantificaron los niveles de MCP-1 utilizando un kit ELISA para (Enzimoinmunoensayo) MCP-1 de rata, en acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D systems, Abingdon, UK). Los límites de detección del ensayo son 31.3-2.000 pg/ml. Para determinar los niveles de MCP-1, las muestras de corteza se sonicaron durante 10 segundos a 4°C in PBS con Inhibidor completo de proteasa (Complete Protease Inhibitor Mixture, Roche Diagnostics). Los homogeneizados fueron centrifugados (13.000×g, 10 min, 4°C) y los sobrenadantes fueron utilizados para las determinaciones. El contenido proteico se determinó siguiendo el método Bradford utilizando albúmina sérica como estándar.

2.9 Grado de peroxidación lipídica

Se determinó mediante el test del ácido tiobarbitúrico para malonildialdehído (MDA) según el método descrito por Das y Ratty (1987). El malonildialdehído es un producto resultante de la acción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno sobre las membranas celulares, proceso conocido como peroxidación lipídica.

Se homogenizó el cerebro por sonicación con ultrasonidos en 10 volúmenes de tampón fosfato (50mM), posteriormente se realizó una desproteinización con ácido tricloroacético y HCl (5M) y se añade ácido tiobarbitúrico 2% p/v disuelto en NaOH (0.5M). Para que el ácido tiobarbitúrico reaccione con el MDA, se calientan las muestras a 90°C durante 15 minutos, después se centrifugó a 12.000g 10 minutos. El cromógeno rosa resultante se midió a 532 nm en un espectrofotómetro (Thermomax®, Molecular Devices). Los resultados se expresaron en nmol por mg de proteína.

2.10 Niveles de 15d-PGJ₂ y PGE₂ en homogenados de corteza cerebral

Los niveles cerebrales de 15d-PGJ₂ y PGE₂ fueron determinados utilizando un kit comercial basado en el método inmuno-enzimático de adsorción (EIA) (kit Prostaglandin E₂ EIA Kit-Monoclonal; Cayman Chemical Europe, Tallinn, Estonia; kit 15d-Prostaglandin J₂ ELISA, DRG InteARNtional, USA). Las muestras fueron homogeneizadas por sonicación con pulsos de ultrasonidos en 300µl de tampón de homogeneización (0.1M tampón fosfato, pH7.4, 1mM EDTA y 10uM indometacina) y purificadas mediante incubación en etanol en un volumen de 4x muestra durante 5 minutos a 4° C y se centrifugaron a 3.000 x g durante 10 minutos, se acidificaron con 10µl de ácido acético glacial. A continuación, se utilizaron minicolumnas de polipropileno de fase reversa (Amprep® C18 octadecyl, Amersham) para purificar las muestras. Primero se lavaron las columnas con 1 ml de H₂O y un 1ml de hexano, posteriormente se pasó el volumen de la muestra y se eluyeron la PGE₂ con 1.5 ml de etilacetato. La fracción etilacetato se conservó a -80°C hasta 12 horas después cuando se evaporó con N₂ y se resuspendió en PBS 0.1M a pH:4. La concentración de PGE₂ y la de 15d-PGJ₂ se determinaron por espectrofotometría (Thermomax®, Molecular Devices) a 405nm a según las instrucciones del fabricante. Los límites de sensibilidad del ensayo para la PGE₂ fue 15 pg/ml y para la 15d-PGJ₂ fueron 36.8 pg/ml.

2.11 Concentración de los metabolitos estables del óxido nítrico nitritos (NO_2^-)

Se calculó su concentración en muestras de tejido cerebral homogeneizadas en cóctel de homogeneización (PBS1X inhibidores de proteasas, Roche). Los niveles de nitritos se determinaron mediante un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Griess (Green y col., 1982). La densidad óptica resultante se cuantificó en un lector de placas (Synergy 2, Biotek) a 540nm. La medida de los niveles de NO_2^- es una técnica muy utilizada y fiable como extrapolación de la actividad NO sintasa cerebral (Salter y col., 1996).

2.12 Análisis del contenido endocannabinoide

La determinación de los niveles de endocannabinoides en muestras de corteza prefrontal se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Tras extracción en cloroformo/methanol/Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (2:1:1, v/v) el extracto lipídico fue prepurificado mediante cromatografía de lecho abierto en minicolumnas de silica-gel que se eluyeron en concentraciones crecientes de metanol. Las medidas de AEA, 2-AG, PEA y OEA fueron obtenidas eluyendo las columnas con cloroformo/methanol 9:1 y fueron concentradas con un evaporador de N_2 . Las muestras fueron sometidas a cromatografía líquida-ionización química-análisis espectrofotométrica de masas tandem (LC-MS/MS) en un aparato TSQ Quantum quadripolar triple (Thermo-Finnigan) equipado con una fuente APCI con modalidad ion-positivo. Las cantidades de 2-AG, PEA y OEA fueron determinadas utilizando una curva de calibración y expresadas en picomoles por miligramo de lípidos y las de AEA en femtomoles por miligramo de lípidos.

2.13 Extracción de tejido fijado para estudios microscópicos

La extracción y preparación del tejido cerebral para inmunohistoquímica se realizó perfundiendo a los animales con paraformaldehído (PFA). Para realizar este protocolo los animales fueron profundamente anestesiados con pentobarbital sódico como se describe anteriormente. En un primer momento se los perfundió a través del ventrículo izquierdo con solución salina estéril (0.9%) como solución lavadora vascular.

A continuación, se utilizó una solución fijadora compuesta por PFA al 4% en tampón fosfato salino (PBS) 0.2M y pH 7.4. Se extrajeron los cerebros y se acabaron de fijar por inmersión en PFA durante tres horas a temperatura ambiente. Por último, se introdujeron en una solución de KPBS 0.1M con sacarosa al 30% a 4° durante 24 horas, de manera que el tejido queda crioprotegido y listo para su posterior procesamiento.

2.14 Inmunofluorescencia

Los cerebros de los animales perfundidos se cortaron con un microtomo de deslizamiento (Leica, SM2000). Los cortes de 30µm se guardaron en líquido anticongelante a -40°C hasta su utilización.

El marcaje de CB2 se realizó con el mismo anticuerpo utilizado en el WB (Santa Cruz®). Para identificar los diferentes tipos celulares en los que se expresa el CB2, se realizó una doble inmunofluorescencia, basándonos en el protocolo de García-Bueno et al., 2009.

En todos los casos, las secciones se incubaron en flotación, en una dilución del anticuerpo primario de CB2 1:1000, en una solución de KPBS + TRITON® al 0.3% y al 5% de albúmina bovina o BSA, a 4°C, durante 48 horas en agitación. A esa dilución se añadieron, en cada caso, los anticuerpos primarios (Abcam) para detectar los marcadores de los tipos celulares cerebrales, es decir, NeuN para neuronas (1:200) y la molécula adaptadora de unión a calcio o Iba-1 (1:500) para microglía.

Tras 48 horas de incubación, las secciones de cerebro se lavaron con KPBS y se incubaron las secciones con los respectivos anticuerpos secundarios anti goat conjugado con Alexa 555 (1:200) y anti Rabbit conjugado con Alexa 488 (1: 200 a 1:500) para detectar los diferentes anticuerpos primarios celulares disueltos en KPBS + TRITON® al 0.3%+BSA al 5% durante 2 horas a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación.

Posteriormente las secciones se lavaron durante 30 minutos con KPBS, se montaron en portas Superfrost plus® (Thermoscientific), se dejaron secar durante 24 horas y se cubrieron con el líquido de montaje Prolong® Gold antifade reagent (Life Technologies®).

Se realizaron experimentos control sobre secciones procedentes de animales ICR control y estresados al incubarlas solo con cada uno de los anticuerpos primarios por separado y luego con ambos anticuerpos secundarios para comprobar que no existen reacciones cruzadas entre los anticuerpos primarios y secundarios, ni entre los secundarios entre si.

2.15 Cuantificación del contenido proteico

El contenido proteico se determinó siguiendo el método de Bradford (1976) que se basa en la capacidad de las proteínas de unirse al colorante azul de Comassie de modo que la absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de proteína en la muestra.

2.16 Análisis estadístico

Los resultados han sido expresados como la media \pm EEM (error estándar de la media). Las comparaciones múltiples se analizaron mediante ANOVA y post-test de Newman-Keuls. Una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa. Cada muestra se analizó por duplicado o triplicado.

PARTE IV

RESULTADOS

Bloque 1

Receptor cannabinoide CB1 y excitotoxicidad/ neuroinflamación inducidas por estrés

1.1 Expresión de CB1 en corteza cerebral de ratón tras estrés agudo. Mecanismos relacionados con el glutamato

El análisis densitométrico de la banda proteica de 60KDa correspondiente a CB1 demostró un aumento de su expresión tras estrés en corteza prefrontal de ratón (Fig. 1A). Esta banda está ausente en los ratones CB1 knock-out en condiciones de control y estrés lo que valida el anticuerpo anti-CB1 utilizado. Este aumento observado en la expresión de proteína concuerda con un incremento del ARNm de CB1 cuantificado por Q-PCR (Fig. 1B).

La exposición a estrés provoca una masiva liberación de glutamato en la hendidura sináptica, que alcanza niveles excitotóxicos en algunas áreas cerebrales (p.e. hipocampo, corteza prefrontal) (Moghaddam, 1993). Para comprobar si el incremento de CB1 inducido por estrés está relacionado con esta liberación de glutamato, a un grupo de animales se les administró el antagonista selectivo de los receptores NMDA, MK-801 (0.1 mg/kg, vía i.p.), 1 hora antes del comienzo del estrés. La administración diaria de MK-801 bloquea parcialmente el aumento en la expresión de ARNm y de la proteína de CB1 inducido por estrés en la corteza prefrontal de los ratones WT (Fig. 1C). La administración del agonista del receptor CB1 ACEA (2.5 mg/kg, vía i.p.) bloqueó el aumento de ARNm (Fig. 1B) y de la expresión proteica del receptor CB1 (Fig. 1C) inducidos por estrés.

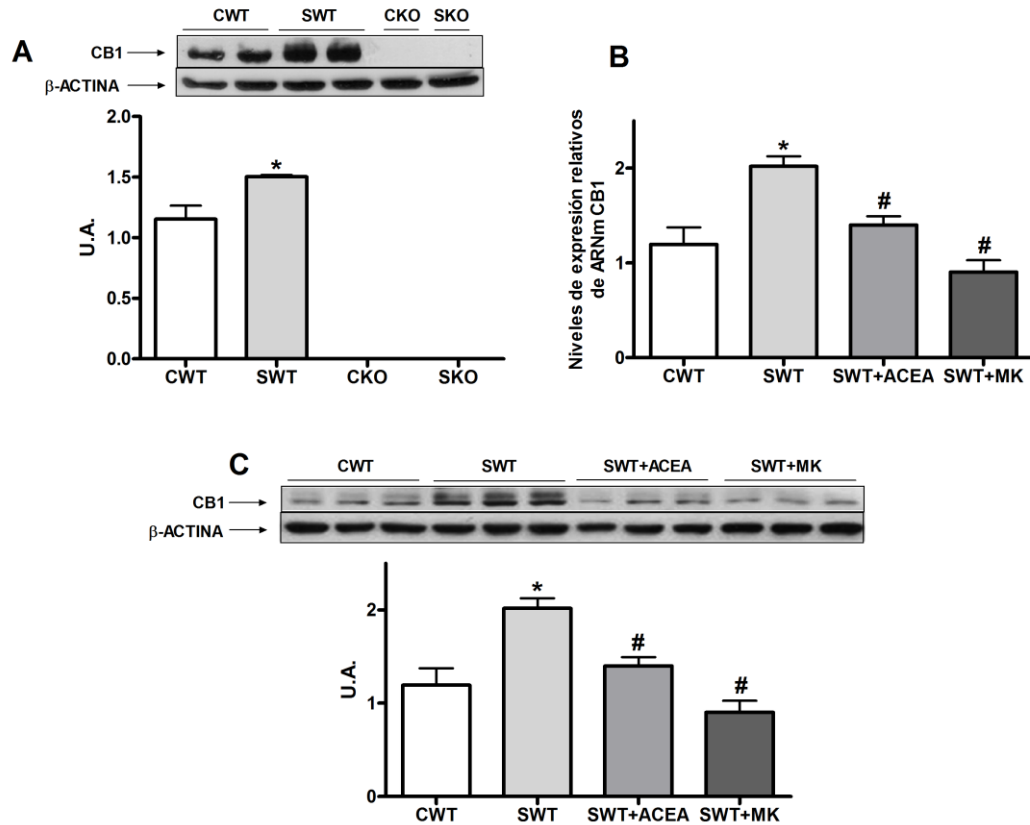


Fig (1) - (A) Western blot y análisis densitométrico de la banda de CB1 en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); knock-out para el receptor CB1 (CKO); knock-out para el receptor CB1 estresados 4 días (SKO) normalizada por β -actina (banda inferior) (* $p < 0.05$ vs control) (ANOVA de una vía y Post-Test de Newman-Keuls). Los datos son representativos de tres experimentos. **(B)** Análisis QPCR de CB1 y **(C)** Western blot de la banda de CB1 en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT) estresados 4 días con preadministración i.p. diaria de ACEA (2.5 mg/kg) (SWT+ACEA) y estresados 4 días con preadministración i.p. diaria de MK-801 (0.1 mg/kg) (SWT+MK) Análisis densitométrico de la banda normalizada por β -actina (banda inferior). Los datos son representativos de tres experimentos. (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls). U.A.= Unidades Arbitrarias.

1.2 Efectos CB1-dependientes sobre la recaptación sinaptosomal de glutamato y sobre la expresión de sus recaptadores

Se ha sugerido que el sistema endocannabinoide puede conferir neuroprotección a través de la inhibición de la neurotransmisión glutamatérgica excitotóxica mediante mecanismos todavía no completamente explicados. Se decidió investigar el posible papel del receptor CB1 en el transporte y metabolismo del glutamato en la corteza prefrontal de ratones WT, WT+ACEA y CB1 KO sometidos a estrés. Como ha sido descrito anteriormente (García-Bueno y col., 2007), la exposición a estrés provoca una disminución de la recaptación sinaptosomal de glutamato en comparación con los animales control (CWT), efecto que es totalmente revertido por la administración de ACEA (Fig. 2A). Por el contrario, los ratones CB1 KO mostraron una marcada reducción del transporte de glutamato en los sinaptosomas corticales tanto en condiciones control como de estrés (Fig. 2A). También comprobamos que estos efectos se correlacionaban con cambios en la expresión del principal transportador astrocítico de glutamato EAAT2. Los análisis por Western blot revelaron que el estrés reduce la expresión de EAAT2 (Fig. 2B) y que el tratamiento con ACEA previene dicha reducción. Como en el caso del transporte de glutamato en sinaptosomas, los ratones KO para CB1 presentan una reducción de la expresión de los transportadores de glutamato en muestras de corteza cerebral (más apreciable en el caso de los animales estresados) (Fig. 2B).

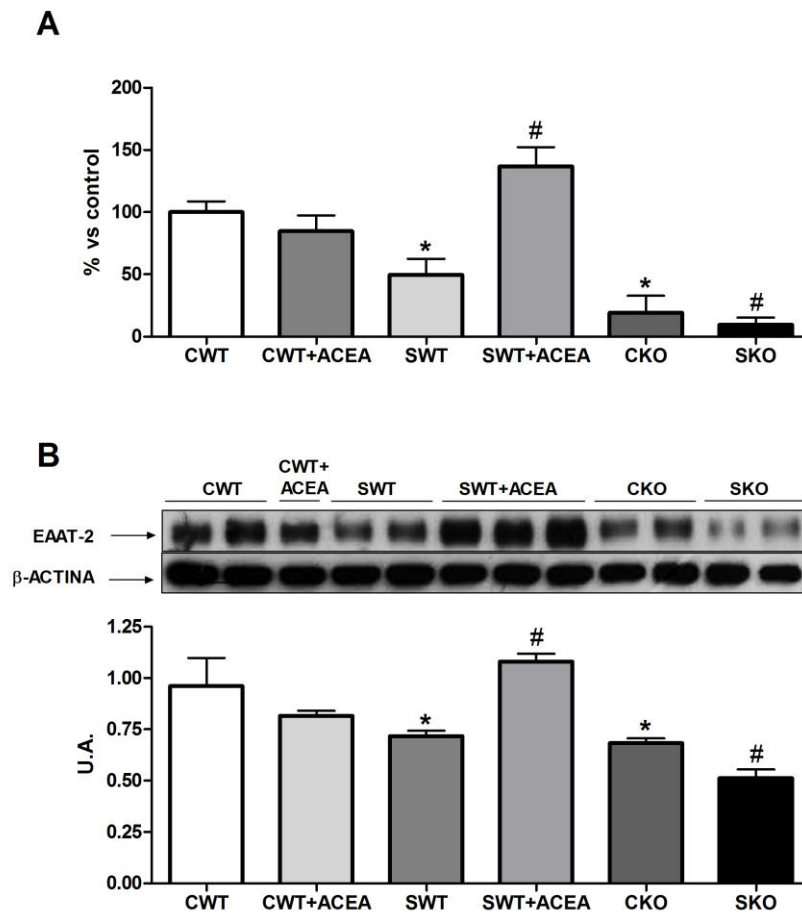


Fig (2) - (A) Efecto del estrés por inmovilización en la recaptación de glutamato en sinaptosomas en muestras de cerebro anterior de ratones control (CWT); con administración IP diaria de ACEA (2.5 mg/kg)(CWT+ACEA); estresados 4 días (SWT); estresados 4 días con administración IP diaria de ACEA (2.5 mg/kg) (SWT+ACEA); knock-out para el receptor CB1 (CKO); knock-out para el receptor CB1 estresados 4 días (SKO). Los datos representan la media muestral +EEM (n=6) (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT)(ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls). **(B)** Caracterización por Western blot del transportador de glutamato astrocítico EAAT2 en muestras de cerebro anterior de ratones control (CWT); con administración IP diaria de ACEA (2.5 mg/kg)(CWT+ACEA); estresados 4 días (SWT); estresados 4 días con administración IP diaria de ACEA (2.5 mg/kg) (SWT+ACEA); knock-out para el receptor CB1 (CKO); knock-out para el receptor CB1 estresados 4 días (SKO) y análisis densitométrico de la banda proteica normalizada por b-actina (banda inferior). Los datos son representativos de tres experimentos. (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls). U.A.= Unidades Arbitrarias.

1.3 Efectos antiinflamatorios derivados de la activación de CB1. Mecanismos implicados.

En general, el sistema endocannabinoide se considera como un sistema endógeno protector contra una excesiva respuesta inflamatoria/inmune en múltiples patologías del SNC. Nuestro modelo de estrés provoca respuestas pro-inflamatorias en el cerebro y en la periferia, caracterizadas por una compleja cascada de mediadores inflamatorios consecutivos (García-Bueno y col., 2008). Nuestros próximos estudios tienen como objetivo dilucidar el papel del receptor CB1 como regulador principal de la respuesta inflamatoria inducida por estrés.

1.3.1 Niveles de corticosterona plasmática

La cuantificación de los niveles de corticosterona plasmática mediante RIA reveló un aumento de la hormona en todos los grupos de animales estresados en comparación con sus respectivos controles. Sin embargo, este aumento es estadísticamente mayor en ratones KO que en los animales WT (Fig. 3). La administración diaria de ACEA no fue capaz de reducir el aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona tras estrés en el momento de la extracción de sangre (Fig. 3), sugiriendo que los efectos antiinflamatorios de este compuesto son independientes de una modulación en los niveles de corticosterona en la respuesta general a estrés.

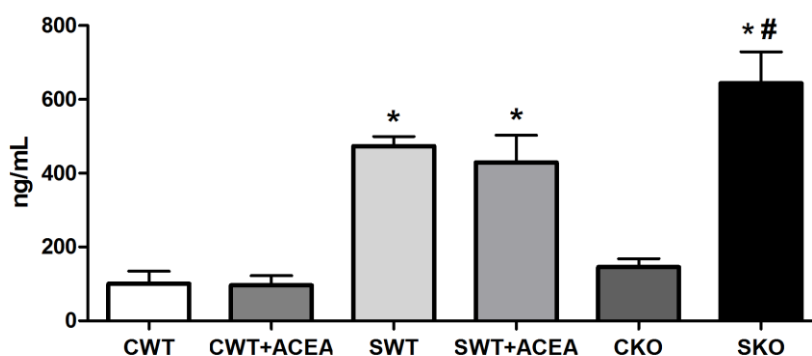


Fig (3) - Niveles plasmáticos de corticosterona en ratones control (CWT); con administración IP diaria de ACEA (2.5 mg/kg)(CWT+ACEA); estresados 4 días (SWT); estresados 4 días con administración IP diaria de ACEA (2.5 mg/kg) (SWT+ACEA); knock-out para el receptor CB1 (CKO); knock-out para el receptor CB1 estresados 4 días (SKO). Los datos representan la media muestral \pm EEM (n=6) (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT)(ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls).

1.3.2 Citocinas proinflamatorias y quimioquinas

Las citocinas proinflamatorias como TNF- α y la quimioquina MCP-1, están entre los primeros mediadores proinflamatorios activados en el cerebro por la masiva liberación de glutamato tras exposición a estrés. El estudio de estos mediadores inflamatorios mostró un perfil antiinflamatorio tras la activación de CB1 por ACEA. Estudios de Q-PCR mostraron un consistente aumento del ARNm de TNF- α en la corteza prefrontal de ratones después del estrés, efectos en parte bloqueado por la administración diaria de ACEA (Fig. 4A). Por el contrario los animales CB1 KO presentaron un marcado incremento en el ARNm de la citocina tras estrés, lo que sugiere un potencial estado inflamatorio crónico en el cerebro de estos animales. Este perfil se mantiene también para la quimioquina MCP-1 en muestras de corteza prefrontal en todos los grupos estudiados, cuyos niveles fueron medidos por ELISA (Fig. 4B).

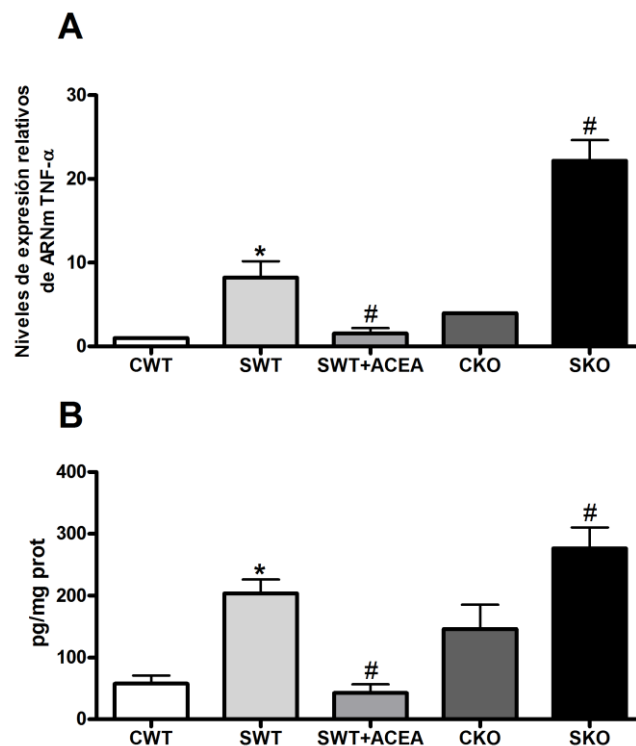


Fig (4) - Análisis de la Q-PCR de TNF- α (**A**) y ELISA de MCP-1 (**B**) en ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT) estresados 4 días con preadministración IP diaria de ACEA (2.5 mg/kg) (SWT+ACEA); knock-out para el receptor CB1 (CKO); knock-out para el receptor CB1 estresados 4 días (SKO). Los datos representan la media muestral +EEM (n=6)(* $p < 0.05$ vs CWT);(# $p < 0.05$ vs SWT)(ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls).

1.3.3 Factor de transcripción nuclear κ B

La activación de NF- κ B depende en parte de la liberación de TNF- α en condiciones de estrés; hemos estudiado el posible papel del receptor CB1 en la regulación de los niveles de expresión de dicho factor. Estudios de Western Blot de la subunidad proinflamatoria de NF- κ B p65 en extractos nucleares (Fig. 5A) y su proteína inhibitoria I κ B α en extractos citosólicos (Fig. 5B) muestran que el receptor CB1 regula la activación de NF- κ B tras estrés. De este modo, la exposición a estrés aumenta la expresión de NF- κ B en extractos nucleares de corteza cerebral, aumento que fue revertido por la administración del agonista CB1 ACEA (Fig. 5A), y que se corresponde inversamente con los niveles de expresión de I κ B α en los extractos citosólicos en los diferentes grupos estudiados (Fig. 5B). Los animales CB1KO en condiciones control presentaron niveles más altos de NF- κ B en extractos nucleares en comparación con sus respectivos controles WT (Fig. 5A) y una consecuente disminución de expresión de la proteína I κ B α en extractos citosólicos (Fig. 5B), sugiriendo un estado de activación mantenida de NF- κ B en estos animales.

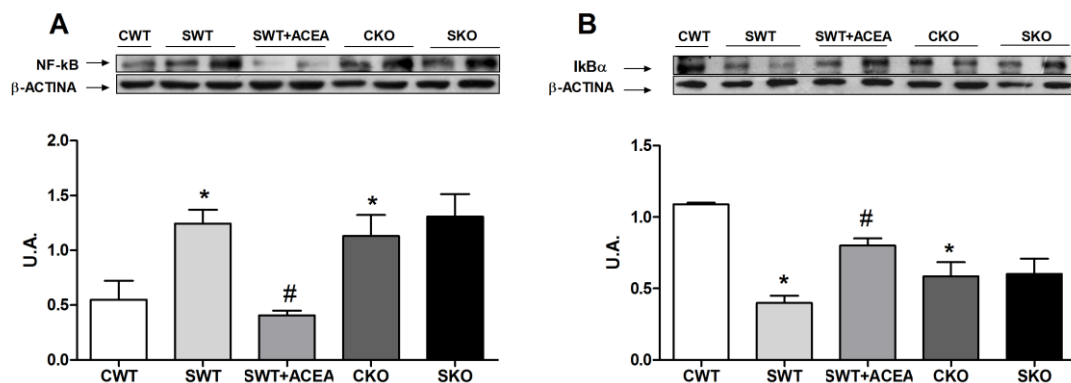


Fig (5) - Caracterización por Western blot de NF- κ B (**A**) y de I κ B α (**B**) en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); estresados 4 días con preadministración de ACEA (2.5 mg/kg); knock-out para el receptor CB1 (CKO); knock-out para el receptor CB1 estresados 4 días (SKO) y análisis densitométrico de la banda proteica normalizada por β -actina (banda inferior). Los datos son representativos de tres experimentos (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls). U.A.=Unidades Arbitrarias.

1.3.4 Enzimas proinflamatorias NOS-2 y COX-2 y niveles de PGE₂

NF- κ B regula la expresión de genes involucrados en la acumulación de mediadores oxidativos/nitrosativos e inflamatorios tras exposición a estrés. Entre otros, NOS-2 y COX-2 son fuentes enzimáticas proinflamatorias que resultan sobre-activadas tras exposición a estrés de manera NF- κ B dependiente. Sus productos (NO⁻ y PGE₂, respectivamente) son potentes moléculas oxidantes/proinflamatorias que pueden producir daño e incluso la muerte celular. La administración de ACEA fue capaz de bloquear completamente el incremento de NOS-2 producido por la exposición a estrés. (Fig. 6A). Como en el caso de otros mediadores proinflamatorios, los ratones CB1 KO, en ambas condiciones de control y estrés, presentan un consistente aumento de NOS-2 en comparación con sus grupos control WT (Fig. 6A).

La interacción entre el receptor CB1 y COX-2 es más compleja, como sugieren nuestros resultados: ACEA no modifica el incremento en la expresión de COX-2 tras estrés, y los animales KO no presentan diferentes niveles proteicos que sus respectivos controles WT (Fig. 6B). Sin embargo, los niveles corticales de PGE₂, que son índice de la actividad de COX-2 en diferentes tejidos, están afectados por las manipulaciones de CB1. Como se puede apreciar en la Fig. 6C, ACEA reduce el aumento de PGE₂ en los tejidos tras estrés, mientras que los animales CB1 KO presentan niveles más altos de esta prostaglandina proinflamatoria.

1.3.5 Peroxidación lipídica

Como índice final del daño celular provocado por exposición a estrés que puede ser afectado por la modulación selectiva del receptor CB1, se ha medido la acumulación del marcador de peroxidación lipídica malonildialdehído (MDA) en la corteza prefrontal de diferentes grupos de ratones. El tratamiento diario con ACEA previno completamente la acumulación de MDA observada después de la exposición a estrés (Fig. 6D). Por el contrario, los cerebros de ratones CB1 KO presentaban los niveles de MDA más altos de todos los grupos estudiados (Fig. 6D).

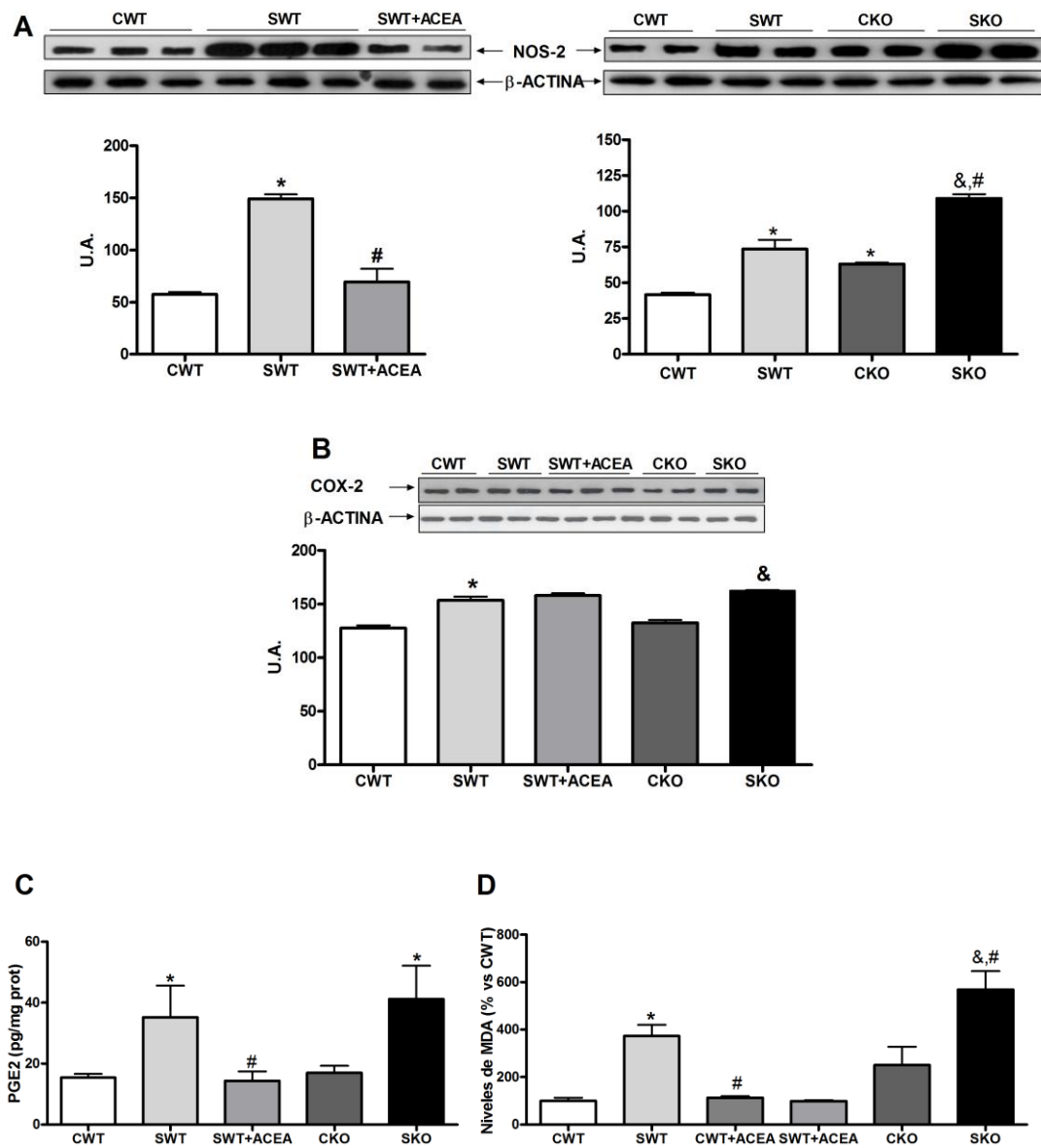


Fig (6) - Caracterización por Western blot de NOS-2 (**A**), de COX-2 (**B**) y kit ELISA de PGE₂ (**C**) en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); estresados 4 días con preadministración de ACEA (2.5 mg/kg); knock-out para el receptor CB1 (CKO); knock-out para el receptor CB1 estresados 4 días (SKO) y análisis densitométrico de la banda proteica normalizada por β -actina (banda inferior). Los datos son representativos de tres experimentos (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT) (& $p < 0.05$ vs CKO) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls). (**D**) Niveles de malondialdehído (MDA) en corteza cerebral de animales control (CWT); estresados 4 días (SWT); con administración IP diaria de ACEA (2.5 mg/kg) (CWT+ACEA); estresados 4 días con administración IP diaria de ACEA (2.5 mg/kg) (SWT+ACEA); knock-out para el receptor CB1 (CKO); knock-out para el receptor CB1 estresados 4 días (SKO). Los datos representan la media muestral +EEM (n=6) (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT); (& $p < 0.05$ vs CKO) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls). U.A.= Unidades Arbitrarias.

1.4 Modulación CB1 dependiente de la vía antiinflamatoria L-PGDS/15d-PGJ₂/PPAR γ

La administración diaria del agonista selectivo del receptor CB1 ACEA previene la formación de mediadores proinflamatorios inducidos por estrés en los ratones WT, mientras que los ratones CB1 KO presentan un marcado proceso neuroinflamatorio. El siguiente bloque de estudios tuvo como objetivo aclarar los posibles mecanismos antiinflamatorios implicados. Un candidato de interés es la vía antiinflamatoria L-PGDS/15d-PGJ₂/PPAR γ , cuya activación confiere neuroprotección en múltiples patologías del SNC, que tienen un componente inflamatorio en su pato-fisiología, como se ha expuesto en la Introducción.

Estudios de Western Blot y posteriores análisis densitométricos (Fig. 7A) muestran un aumento significativo de la fuente enzimática de 15d-PGJ₂ L-PGDS en la corteza prefrontal de ratones tratados con ACEA en comparación con sus controles tras exposición a estrés. Al contrario, los niveles de proteína L-PGDS están reducidos en el cerebro de ratones CB1 KO tras exposición a estrés (Fig. 7A). Consecuentemente, los niveles de la prostaglandina antiinflamatoria 15d-PGJ₂ cuantificados por ELISA están aumentados en los ratones tratados con ACEA comparado con sus respectivos controles (Fig. 7C). En ambos grupos de ratones WT y CB1 KO la exposición a estrés provocó una marcada disminución de los niveles de 15d-PGJ₂ pero no hubo diferencias entre los animales WT y KO.

Por último, el análisis WB del receptor nuclear PPAR γ presenta un patrón similar de la regulación de su agonista endógeno 15d-PGJ₂ en la corteza prefrontal de los diferentes grupos de animales (Fig. 7B). Los animales KO presentaron niveles estadísticamente más bajos de PPAR γ en comparación a sus grupos controles (Fig. 7B).

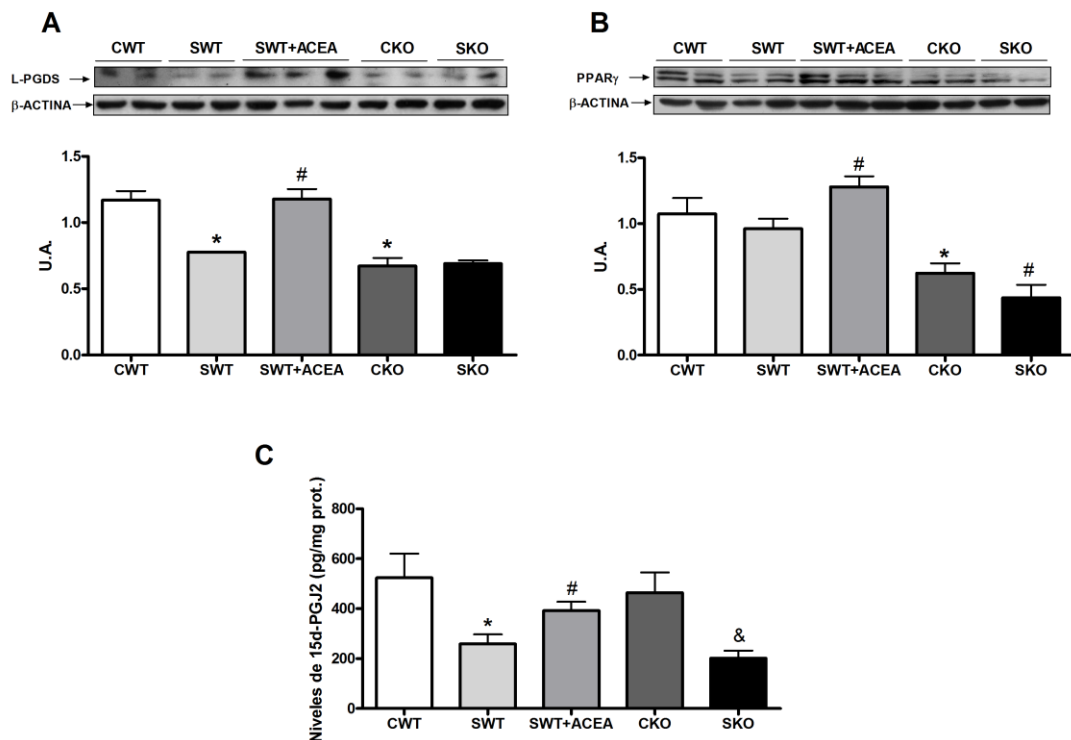


Fig (7) - Caracterización por Western blot de L-PGDS (**A**) y PPAR γ (**B**) en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); estresados 4 días con preadministración de ACEA (2.5 mg/kg) knock-out para el receptor CB1 (CKO); knock-out para el receptor CB1 estresados 4 días (SKO) y análisis densitométrico de la banda proteica normalizada por β -actina (banda inferior). Los datos son representativos de tres experimentos. (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT); (& $p < 0.05$ vs CKO) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls). (**C**) Niveles de 15d-PGJ2 en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); estresados 4 días con preadministración de ACEA (2.5 mg/kg) knock-out para el receptor CB1 (CKO); knock-out para el receptor CB1 estresados 4 días (SKO). Los datos representan la media muestral \pm EEM ($n=6$) (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT); (& $p < 0.05$ vs CKO) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls). U.A.= Unidades Arbitrarias.

1.5 Comprobación de que los efectos antiexcitotóxicos/antiinflamatorios de ACEA son dependientes de CB1

Para comprobar que los efectos de ACEA están mediados por el receptor CB1, hemos estudiado sus efectos en ratones CB1 KO sobre algunos de los parámetros excitotóxicos (expresión de EAAT2) e inflamatorios (expresión de NOS-2 y niveles de MDA) más representativos tras exposición a estrés subcrónico. Como ha sido mostrado con anterioridad (Fig. 2), la exposición a estrés provoca una reducción en la expresión de EAAT-2 en la corteza prefrontal de ratones, efecto revertido por el tratamiento previo con ACEA. Este efecto desaparece en los ratones CB1 KO tratados con ACEA (Fig. 8A). Un efecto parecido

se encuentra en la expresión de NOS-2 (Fig. 8B) y en los niveles de MDA (Fig. 8C) donde los efectos neuroprotectores de ACEA se pierden en los ratones CB1 KO en comparación con los WT. Estos resultados sugieren que en nuestro modelo de estrés los efectos observados de ACEA dependen en gran medida del receptor CB1.

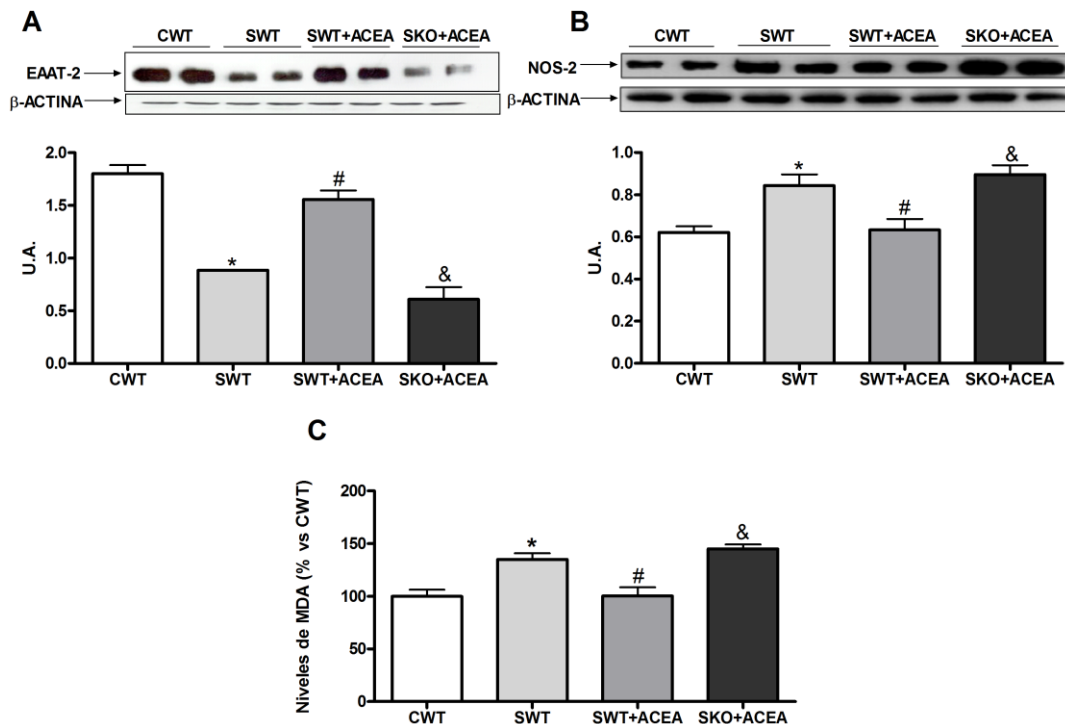


Fig (8) - Western blot y análisis densitométrico de la banda de EAAT-2 (**A**) y de NOS-2 (**B**) en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT) estresados 4 días con preadministración IP diaria de ACEA (2.5 mg/kg) (SWT+ACEA); knock-out para el receptor CB1 estresados 4 días con preadministración IP diaria de ACEA (2.5 mg/kg) (SKO+ACEA) y análisis densitométrico de la banda proteica normalizada por β -actina (banda inferior). Los datos son representativos de 3 experimentos (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT); (& $p < 0.05$ vs SWT+ACEA) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls). (**C**) Niveles de malondialdehído (MDA) en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT) estresados 4 días con preadministración IP diaria de ACEA (2.5 mg/kg) (SWT+ACEA); knock-out para el receptor CB1 estresados 4 días con preadministración IP diaria de ACEA (2.5 mg/kg) (SKO+ACEA). Los datos representan la media muestral +EEM (n=6) (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls). U.A.= Unidades Arbitrarias.

Bloque 2

Receptor cannabinoide CB2 y excitotoxicidad/ neuroinflamación inducidas por estrés

En el siguiente bloque se estudió la expresión del receptor CB2 a nivel de la corteza prefrontal en condiciones basales y tras estrés repetido. Posteriormente, se estudió el efecto de la sobreexpresión genética/estimulación farmacológica del receptor CB2 en nuestro modelo de neuroinflamación inducida por estrés.

2.1 Expresión de CB2 en corteza cerebral tras estrés agudo

Análisis de Western Blot y Q-PCR demostraron que la exposición a estrés no causó modificaciones en la expresión del receptor CB2 ni en sus niveles de ARNm (Fig. 9A-B).

Paralelamente, se estudió la localización del receptor CB2 en la corteza cerebral por inmunohistoquímica de doble fluorescencia. Se detectó inmunoreactividad para CB2 en microglía (Fig. 10) y neuronas (Fig. 11) tanto en condiciones de control y estrés. La inmunoreactividad se localiza asociada a la membrana plasmática y a las ramificaciones (sobre todo en el caso del estrés). En el caso de la tinción en neuronas, CB2 se localiza fundamentalmente en las membranas plasmáticas con algunos puntos en el interior celular. No se observaron modificaciones ni en intensidad ni en distribución celular en la inmunotinción para CB2 en corteza cerebral tras estrés repetido en células microgliales (Fig. 10) y neuronales (Fig. 11).

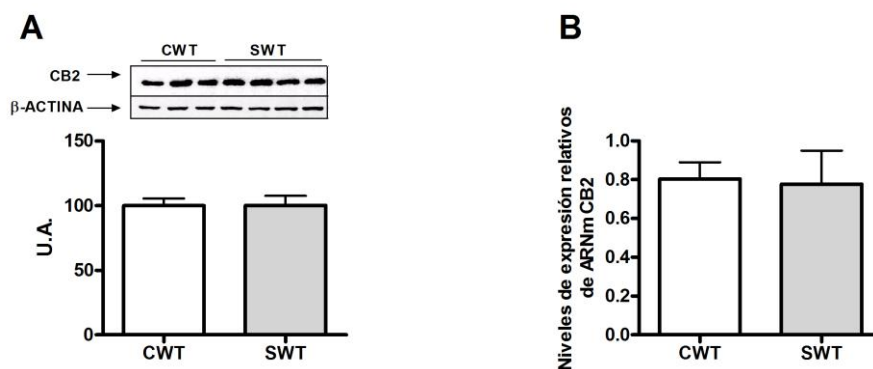


Fig (9) - (A) Caracterización por Western blot de CB2 en corteza cerebral de ratones control (CWT) y estresados 4 días (SWT) y análisis densitométrico de la banda proteica normalizada por β -actina (banda inferior). Los datos son representativos de 3 experimentos (ANOVA de una vía y Test de Newman-Keuls). **(B)** Análisis de la Q-PCR de CB2 en ratones control (CWT) y estresados 4 días (SWT). Los datos representan la media muestral +EEM (n=6) (ANOVA de una vía y Test de Newman-Keuls). U.A.= Unidades Arbitrarias.

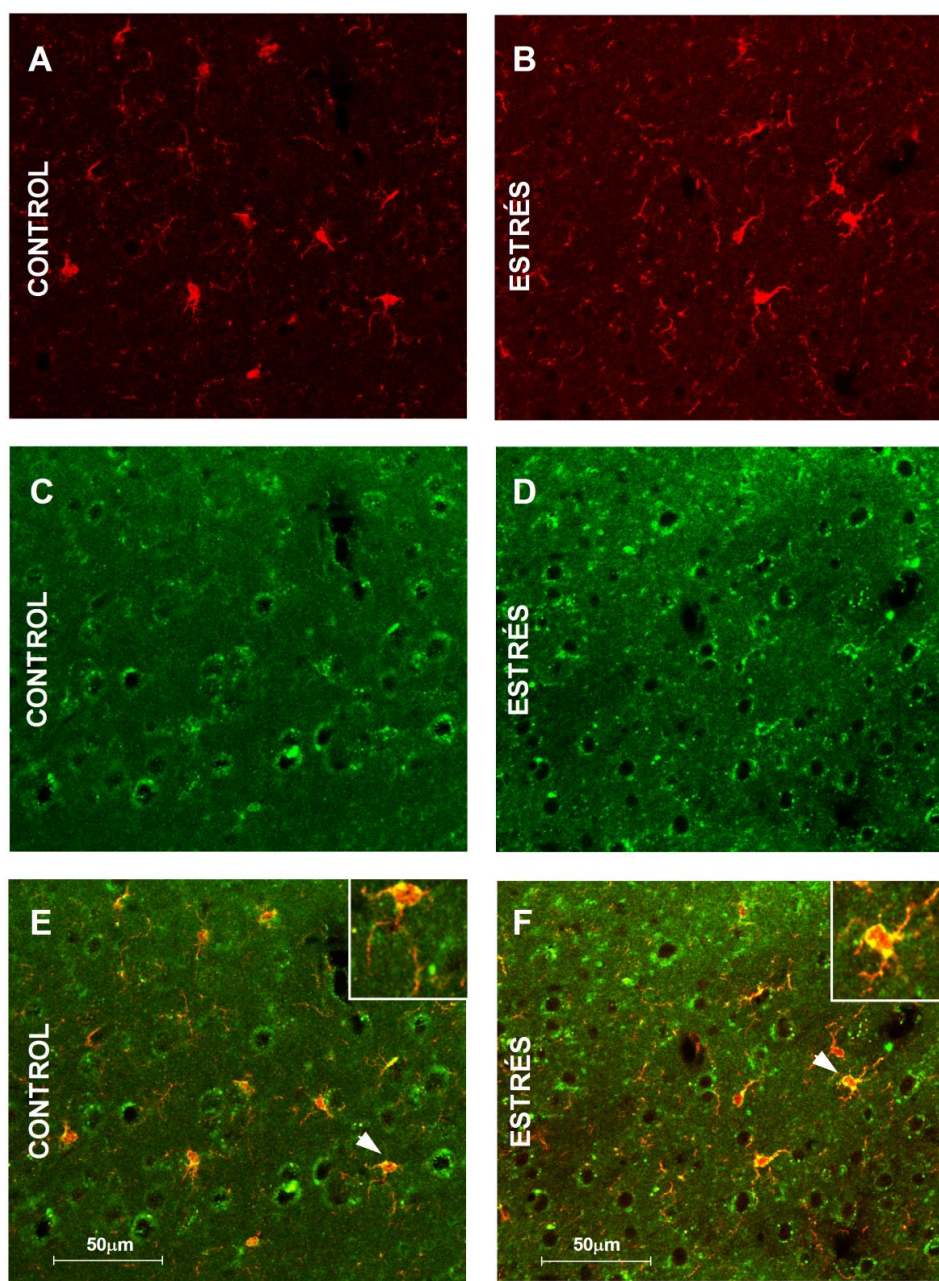


Fig (10) - Secciones de 30µm de corteza prefrontal de ratones ICR en condiciones control (columna izquierda) y estrés (columna derecha). La microglia se identificó con Iba1 en rojo (A y B); CB2 fue marcado en verde (C y D); CB2 colocaliza con la microglia en áreas superpuestas que aparecen en amarillo en las imágenes combinadas (E y F). Escala: 50µm.

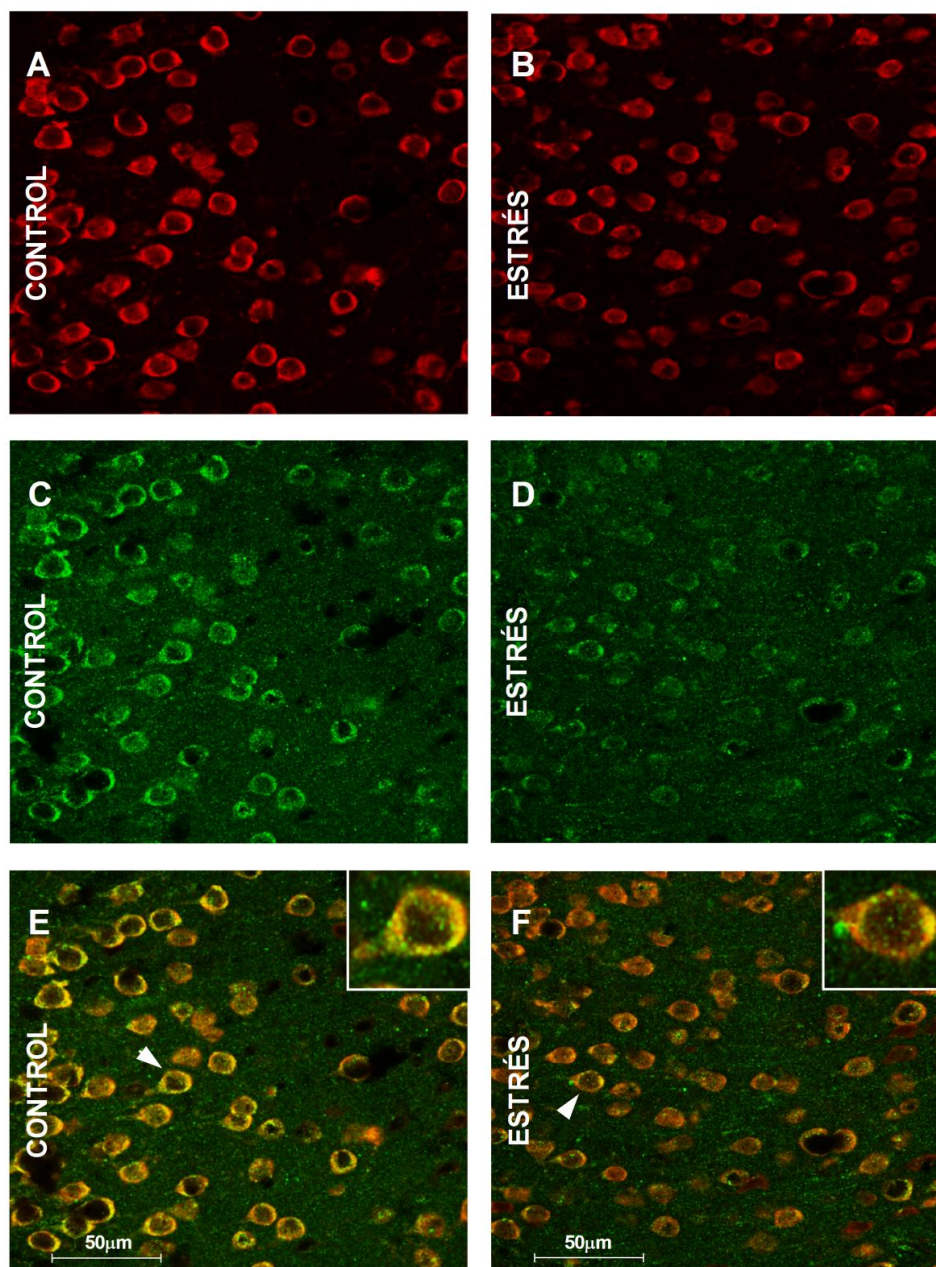


Fig (11) - Secciones de 30μm de corteza prefrontal de ratones ICR en condiciones control (columna izquierda) y estrés (columna derecha). Las neuronas se identificaron con NeuN en rojo (A y B); CB2 fue marcado en verde (C y D); CB2 colocaliza con las neuronas en áreas superpuestas que aparecen en amarillo en las imágenes combinadas (E y F). Escala: 50μm.

2.2 Recaptación de glutamato tritiado

En situación control los ratones transgénicos que sobreexpresan CB2 y los tratados con el agonista CB2 JWH-133 (2.0 mg/kg, vía i.p.) recaptan más glutamato que sus controles mientras que tras estrés no hay diferencias entre los dos grupos estresados (Fig. 12).

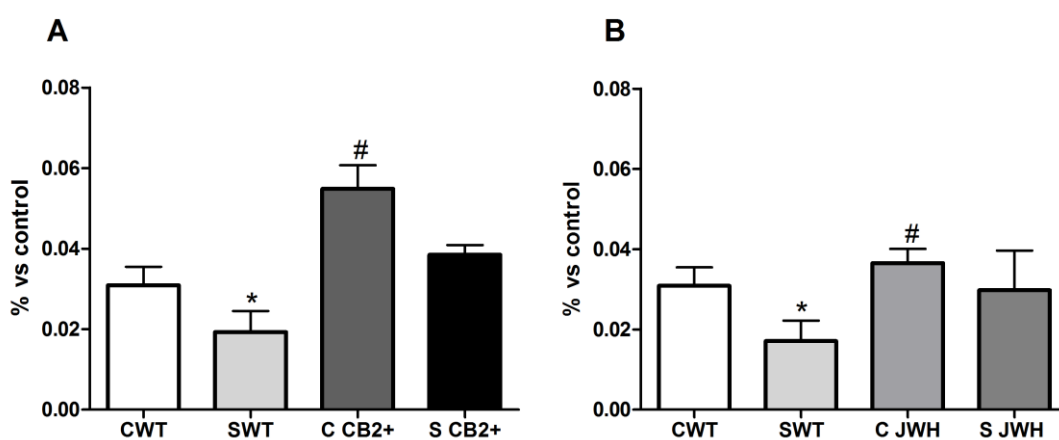


Fig (12) - Efecto del estrés por inmovilización en la recaptación de glutamato en sinaptosomas de cerebro anterior de (A) ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 (C CB2+); transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 estresados 4 días (S CB2+) y en (B) ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); controles con administración IP diaria de JWH133 (2.0 mg/kg) (C JWH); estresados 4 días con administración IP diaria de JWH-133 (2.0 mg/kg) (S JWH). Los datos representan la media muestral +EEM (n=6)(* p<0.05 vs SWT); (# p <0.05 vs C JWH) (ANOVA de una vía y Test de Newman-Keuls).

2.3 Efectos antiinflamatorios derivados de la activación de CB2.

Mecanismos implicados

Diferentes estudios han evidenciado que el receptor CB2 tiene un papel neuromodulador en modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas (Benito y col., 2007) ya que su activación reduce el proceso neuroinflamatorio (Klegeris y col., 2003; Palazuelos y col., 2008). Nuestros próximos estudios tienen como objetivo dilucidar el papel del receptor CB2 como regulador principal de la respuesta inflamatoria inducida por estrés.

2.3.1 Niveles de corticosterona plasmática

La cuantificación de los niveles de corticosterona plasmática mediante RIA reveló un aumento de la hormona en todos los grupos de animales estresados en comparación con sus respectivos controles. La administración diaria de JWH y la sobreexpresión del receptor CB2 no fueron capaces de reducir el aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona tras estrés en el momento de la extracción de sangre (Fig. 13), sugiriendo que los posibles efectos antiinflamatorios de la activación de CB2 son independientes de una modulación en los niveles de corticosterona en la respuesta general a estrés.

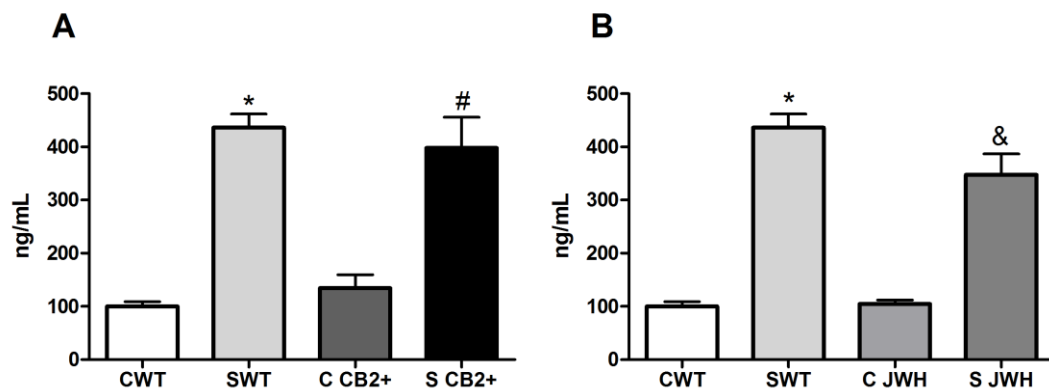


Fig (13) - Niveles de corticosterona plasmática en corteza cerebral de **(A)** ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 (C CB2+); transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 estresados 4 días (S CB2+) y en **(B)** ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); controles con administración IP diaria de JWH 133 (2.0 mg/kg) (C JWH); estresados 4 días con administración IP diaria de JWH 133 (2.0 mg/kg) (S JWH). Los datos representan la media muestral +EEM (n=6) (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs C CB2+); (& $p < 0.05$ vs C JWH) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls).

2.3.2 Citocinas proinflamatorias y quemoquinas: TNF- α y MCP-1

El estudio de otros mediadores inflamatorios activados por estrés como la citocina proinflamatoria TNF- α y la quemoquina MCP-1 mostró un perfil antiinflamatorio en ratones que sobreexpresan el receptor CB2 y en los ratones tratados con el agonista del receptor CB2 JWH-133. Estudios de QPCR mostraron un consistente aumento del ARNm de TNF- α en la corteza prefrontal de ratones tras la exposición a estrés (Fig. 14A), efectos en parte bloqueados por la sobreexpresión de CB2 (Fig. 14A) y por la administración de JWH

133. (Fig. 14B). El mismo perfil se mantiene por la quimioquina MCP-1, donde la sobreexpresión del receptor CB2 bloqueó el aumento de MCP-1 inducido por estrés (Fig. 14C). En el caso de la administración del agonista JWH-133 no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Fig. 14D).

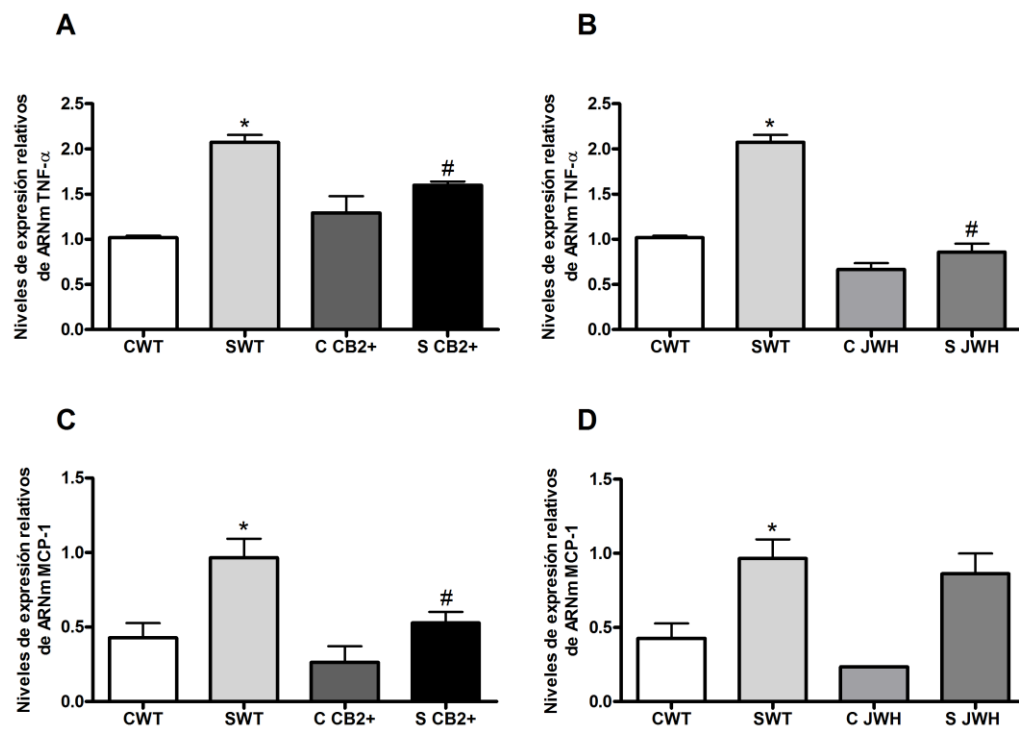


Fig (14) - Análisis de la QPCR de TNF- α (**A**) y de MCP-1 (**C**) en ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 (C CB2+) y transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 estresados 4 días (S CB2+) y análisis de la QPCR de TNF- α (**B**) y de MCP-1(**D**) en ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); controles con administración IP diaria de JWH 133 (2.0 mg/kg) (C JWH); estresados 4 días con administración IP diaria de JWH 133 (2.0 mg/kg) (S JWH). Los datos representan la media muestral +EEM (n=6) (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls).

2.3.3 Factor nuclear κ B (NF- κ B)

Análisis por Western Blot mostraron que la exposición a estrés induce un aumento de la expresión del factor nuclear κ B (Fig. 15A-C). Los ratones CB2+ estresados presentaron una disminución de la expresión de NF- κ B en extractos nucleares comparado con sus

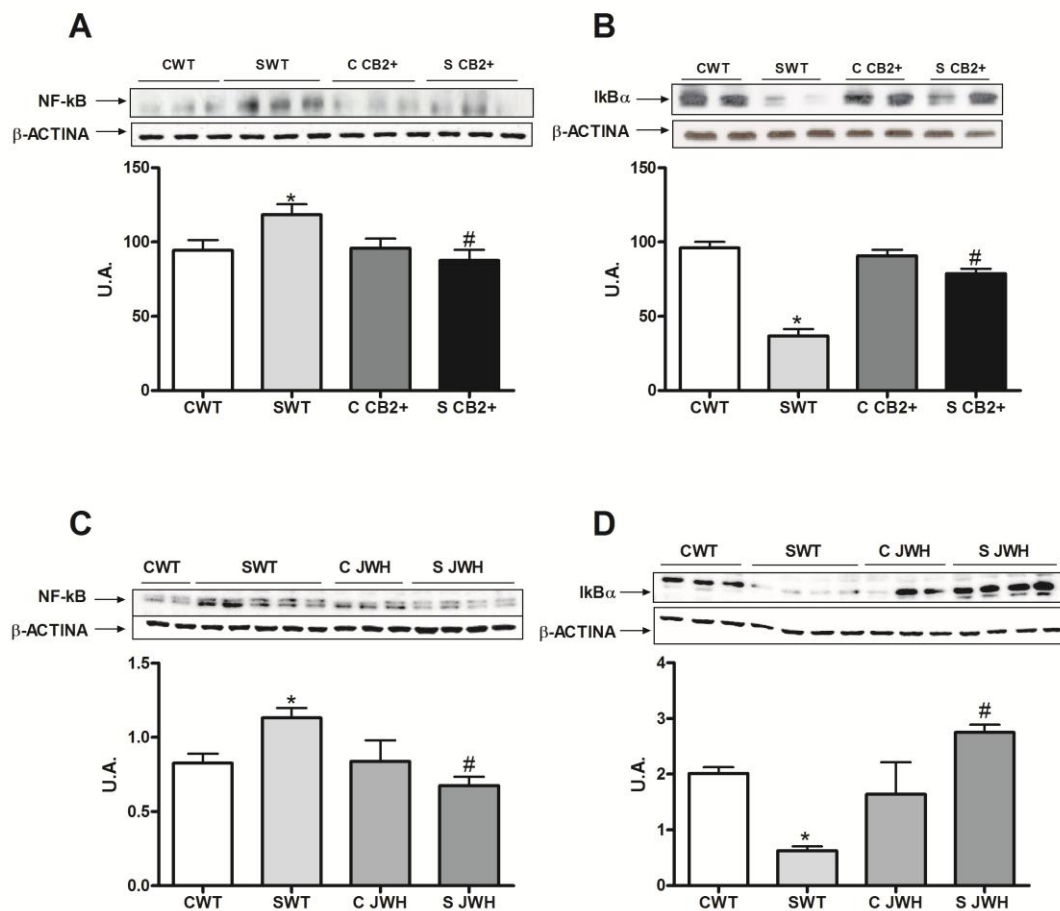


Fig (15) - Caracterización por Western blot de NF- κ B (A) y I κ B α (B) en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 (C CB2+) y transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 estresados 4 días (S CB2+) y análisis densitométrico de la banda proteica normalizada por β -actina (banda inferior). Los datos son representativos de 3 experimentos (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT) (ANOVA y Post-Test de Newman-Keuls). Caracterización por Western blot de NF- κ B (C) y I κ B α (D) en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); controles con administración diaria de JWH 133 (2.0 mg/kg) (C JWH); estresados 4 días con administración diaria de JWH 133 (2.0 mg/kg) (S JWH) y análisis densitométrico de la banda proteica normalizada por β -actina (banda inferior). Los datos son representativos de 3 experimentos (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT) (ANOVA de una vía y Test de Newman-Keuls). U.A.= Unidades Arbitrarias.

respectivos controles (Fig. 15A). Como en el caso de la sobreexpresión de CB2, la activación farmacológica de este receptor por JWH-133 bloquea el aumento de expresión de NF- κ B inducido por estrés (Fig. 15C). Estos valores se corresponden con la disminución del factor inhibitorio de NF- κ B I κ B α en extractos citosólicos de ratones estresados y al bloqueo de esta disminución en ratones estresados que sobreexpresan el receptor CB2 (Fig. 15B) y en los estresados tratados con JWH-133 (Fig. 15D).

2.3.4 Expresión de NOS-2 y COX-2 y niveles de PGE₂ en corteza cerebral de ratón control y tras estrés agudo

NOS-2 y COX2 son fuentes enzimáticas proinflamatorias que resultan sobreactivadas tras exposición a estrés de forma NF- κ B (p65) dependiente. El análisis densitométrico de las bandas proteicas de 130kDa correspondiente a NOS-2 (16A -C) demostró un aumento de su expresión tras estrés en homogenados de corteza cerebral. Los ratones CB2+ y los tratados con administración diaria de JWH-133 estresados presentaron una disminución significativa de NOS-2 comparado con sus respectivos controles (SWT) (Fig. 16A -C). En el caso de COX-2 el estrés provocó un aumento de su expresión (Fig. 16B); los ratones CB2+ estresados presentan niveles disminuidos de este enzima en comparación a sus controles (Fig. 16B), mientras que los administrados con JWH-133 estresados presentaron niveles similares a los ratones de su grupo control (SWT) (Fig. 16D). La sobreexpresión del receptor CB2 y el tratamiento diario con JWH-133 previnieron el aumento de los niveles corticales de la prostaglandina proinflamatoria PGE₂ inducido por estrés Fig. 16 (E-F).

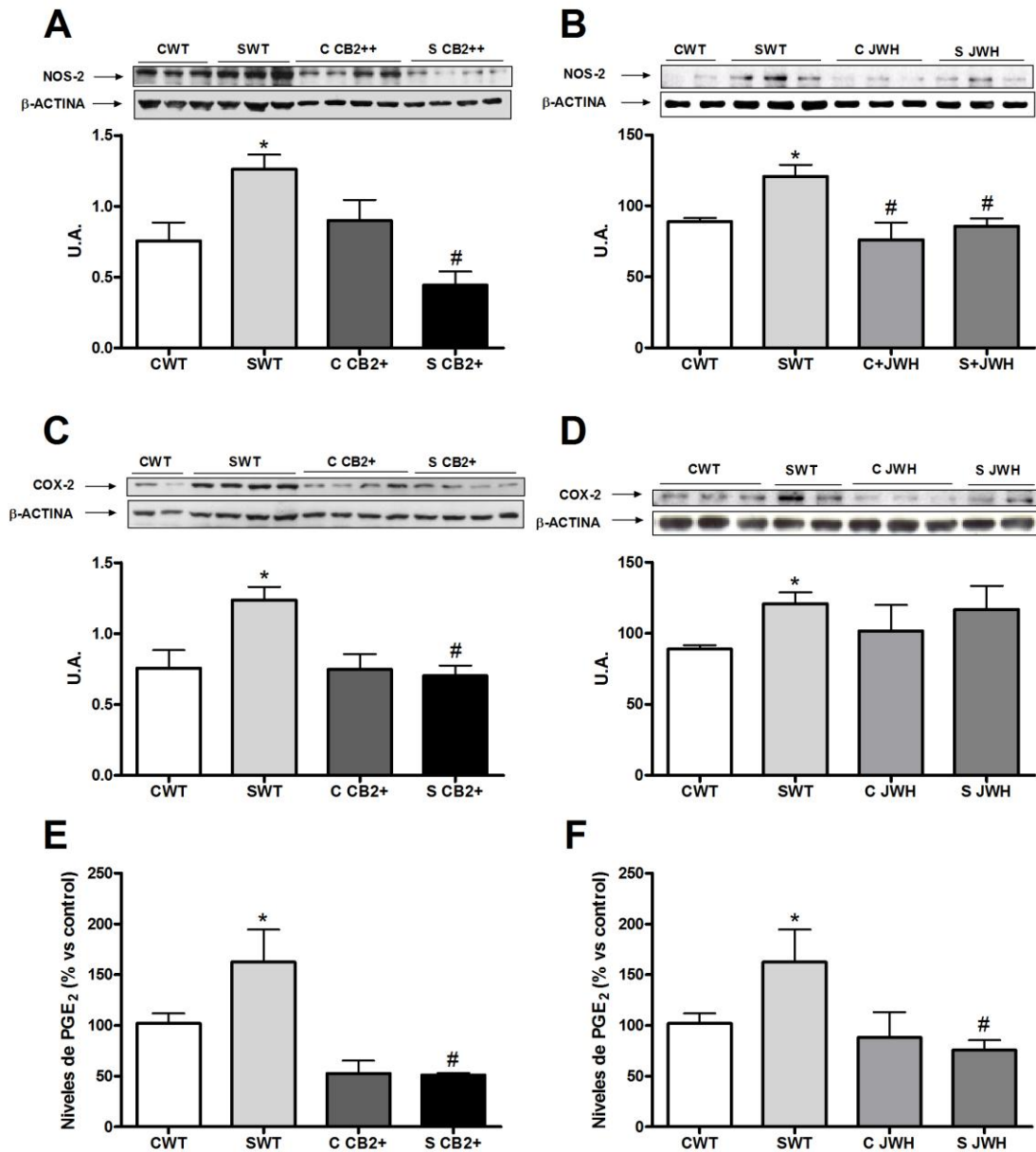


Fig (16) - Western blot y análisis densitométrico de la banda de NOS-2 (**A**) y de COX-2 (**B**) y kit ELISA de PGE₂ (**E**) en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 (C CB2+) y transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 estresados 4 días (S CB2+) y Western blot y análisis densitométrico de la banda de NOS-2 (**C**) y COX-2 (**D**) y kit ELISA de PGE₂ (**F**) en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); controles con administración diaria de JWH 133 (2.0 mg/kg)(C JWH); estresados 4 días con administración diaria de JWH 133 (2.0 mg/kg) (S JWH) y análisis densitométrico de la banda proteica normalizada por β-actina (banda inferior). Los datos son representativos de 3 experimentos (* p<0.05 vs CWT); (# p<0.05 vs SWT)(ANOVA de una vía y Test de Newman-Keuls). U.A.= Unidades Arbitrarias.

2.3.5 Peroxidación lipídica y concentración de los metabolitos estables del óxido nítrico: MDA y nitritos (NO_2^-)

La exposición a estrés provocó un aumento significativo de los niveles de MDA y NO_2^- en corteza (Fig. 17). Los cerebros de ratones CB2+ estresados presentaron los niveles más bajos de MDA de todos los grupos estudiados (Fig. 17A). La sobreexpresión del receptor CB2 y la administración de JWH -133 previnieron la acumulación de MDA (Fig. 17A-C) y de NO_2^- (Fig. 17B-D) provocada por la exposición a estrés.

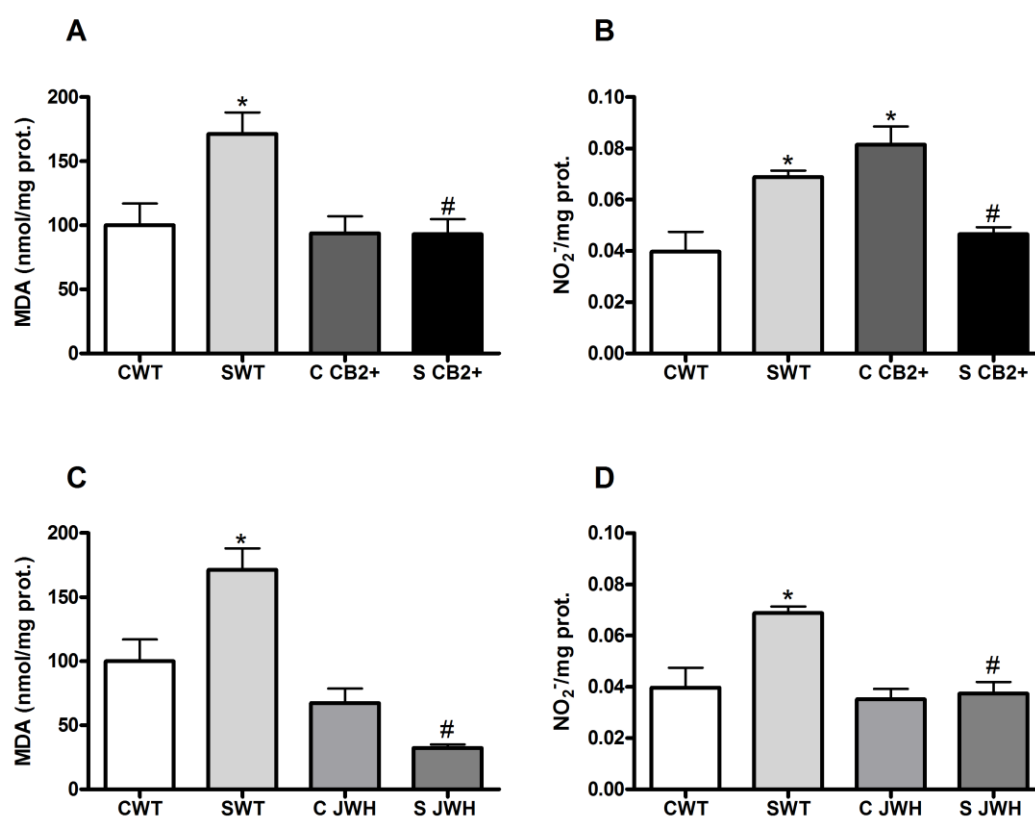


Fig (17) - Niveles de malondialdehído (MDA) (**A**) y niveles de NO_2^- (**B**) en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 (C CB2+) y transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 estresados 4 días (S CB2+). Niveles de malondialdehído (MDA) (**C**) y niveles de NO_2^- (**D**) en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); controles con administración diaria de JWH 133 (2.0 mg/kg)(C JWH); estresados 4 días con administración diaria de JWH 133 (2.0 mg/kg) (S JWH). Los datos representan la media muestral +EEM (n=6) (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT) (ANOVA de una vía y Test de Newman-Keuls).

Bloque 3

Ratones CB2 KO y excitotoxicidad/ neuroinflamación inducidas por estrés

3.1 Recaptación de glutamato tritiado

La exposición a estrés induce una disminución de la recaptación de glutamato y en la expresión de su transportador astroglial EAAT-2. Análisis en sinaptosomas procedentes de corteza prefrontal de ratones evidencian que los ratones CB2 KO estresados presentan una disminución de la recaptación de glutamato en comparación a su grupo control (SWT) (Fig.18).

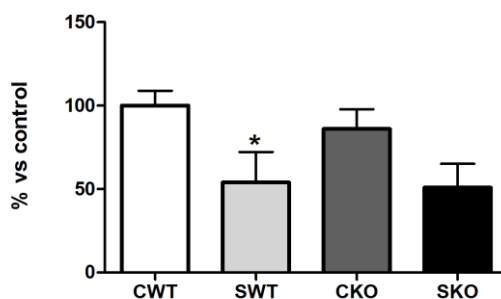


Fig (18) - Efecto del estrés por inmovilización en la recaptación de glutamato en sinaptosomas de cerebro anterior de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); knock-out para el receptor CB2; knock-out para el receptor CB2 estresados 4 días. Los datos son representativos de 3 experimentos (* $p < 0.05$ vs SWT) (ANOVA de una vía y Test de Newman-Keuls).

3.2 Ratones CB2 KO y neuroinflamación

3.2.1 Niveles de corticosterona plasmática

La cuantificación de los niveles de corticosterona plasmática mediante RIA reveló un aumento de corticosterona en los grupos de animales estresados en comparación con sus respectivos controles (Fig.19).

La ausencia del receptor CB2 no modificó los niveles plasmáticos de corticosterona tras estrés en el momento de la extracción de sangre (Fig. 19), sugiriendo que la ausencia de este receptor no regula la modulación de los niveles de corticosterona en la respuesta general a estrés.

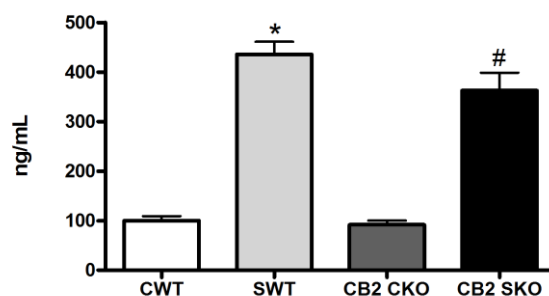


Fig (19) - Niveles de corticosterona plasmática en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); knock-out para el receptor CB2; knock-out para el receptor CB2 estresados 4 días. Los datos representan la media muestral +EEM (n=6) (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls).

3.2.2 Citocinas proinflamatorias y quemoquinas

Análisis Q-PCR de la citocina TNF- α y de la quimioquina MCP-1 demostraron que los ratones CB2 KO estresados presentaron los niveles más altos de estos parámetros proinflamatorios de todos los grupos (Fig. 20).

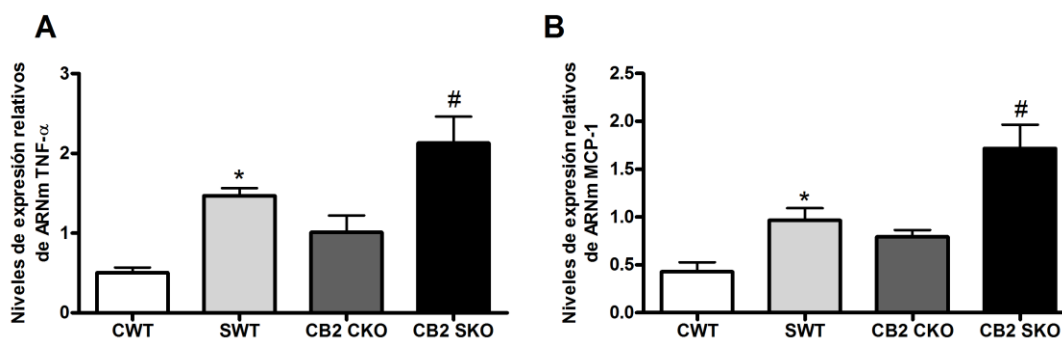


Fig (20) - Análisis Q-PCR de TNF- α (A) y de MCP-1 (B) en ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); knock-out para el receptor CB2; knock-out para el receptor CB2 estresados 4 días. Los datos representan la media muestral +EEM (n=6) (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls).

3.2.3 Factor nuclear κ B (NF- κ B)

Estudios de Western Blot de la subunidad proinflamatoria de NF- κ B p65 en extractos nucleares (Fig. 21A) muestran que ambos grupos de animales KO presentaron niveles más altos de la expresión de NF- κ B en extractos nucleares en comparación con sus respectivos controles. Análisis Western Blot de la proteína inhibitoria de NF- κ B I κ B α en extractos citosólicos (Fig. 21B) muestran que el estrés induce una degradación de I κ B α y que los ratones CB2 KO presentan un incremento de esta degradación en comparación a su grupo control (SWT) (Fig. 21B).

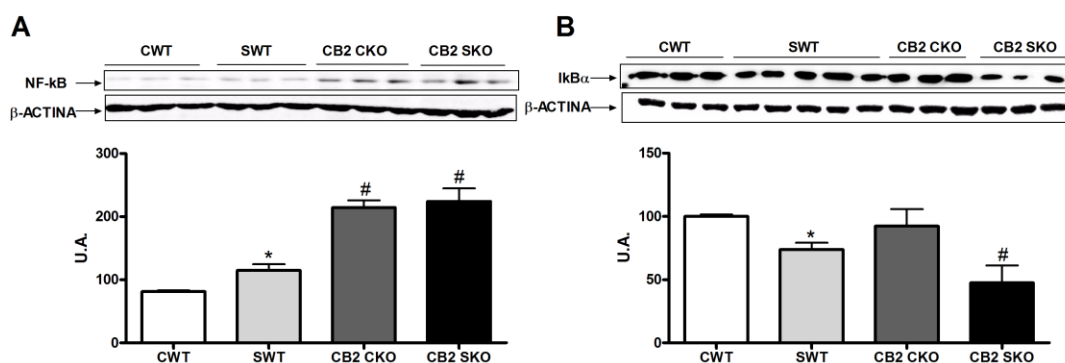


Fig (21) - Caracterización por Western blot de NF- κ B en extractos nucleares (**A**) y de I κ B α en extractos citosólicos (**B**) en ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); knock-out para el receptor CB2; knock-out para el receptor CB2 estresados 4 días y análisis densitométrico de la banda proteica normalizada por b-actina (banda inferior). Los datos son representativos de 3 experimentos (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls). U.A.= Unidades Arbitrarias.

3.2.4 Expresión de NOS-2, COX2 y niveles de PGE₂ en corteza cerebral de ratón control y tras estrés agudo

Análisis Western Blot de NOS-2 mostraron que el incremento de expresión de esta proteína inducido por estrés fue más marcado en los ratones estresados CB2 KO en comparación con sus controles SWT y que en condiciones basales los ratones CB2 KO presentaron niveles incrementados de NOS-2 (Fig. 22A). La exposición a estrés provocó un aumento de expresión de COX-2, mientras que la expresión de esta proteína no se modificó en los ratones CB2 KO en ambos grupos de control y tras estrés repetido (Fig. 22B). Los ratones CB2 KO presentaron niveles incrementados de la prostaglandina proinflamatoria PGE₂ en condiciones basales y tras exposición a estrés repetido en comparación con sus controles (Fig. 22C).

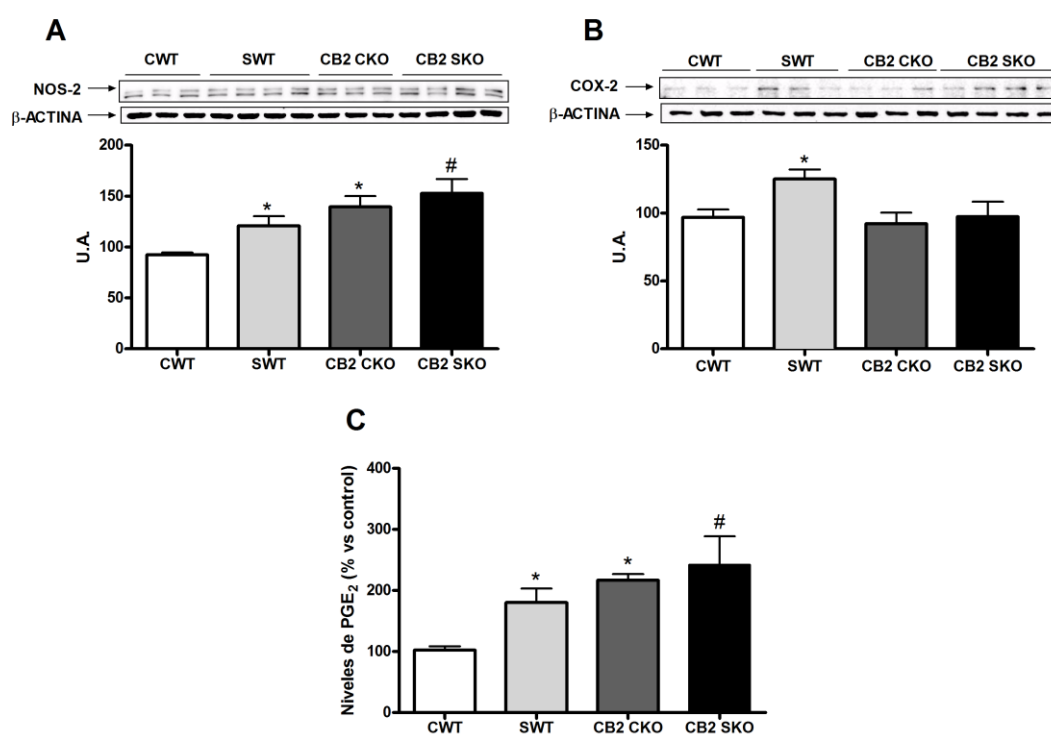


Fig (22) - Western blot y análisis densitométrico de la banda de NOS-2 (**A**) y de COX-2 (**B**) y kit ELISA de PGE₂ (**C**) en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); knock-out para el receptor CB2 (CB2 CKO); knock-out para el receptor CB2 estresados 4 días (CB2 SKO) y análisis densitométrico de la banda proteica normalizada por β-actina (banda inferior). Los datos son representativos de 3 experimentos (* $p < 0.05$ vs CWT); (# $p < 0.05$ vs SWT) (ANOVA de una vía y Test de Newman-Keuls). U.A.=Unidades Arbitrarias.

3.2.5 Peroxidación lipídica y concentración de los metabolitos estables del óxido nítrico: nitritos (NO_2^-)

Como índice final del daño celular provocado por exposición a estrés que puede ser afectado por la ausencia del receptor CB2, se ha medido la acumulación de MDA y de NO_2^- en ratones CB2 KO. Nuestros resultados muestran que el estrés provoca un aumento significativo de los niveles de MDA (Fig. 23A) y nitritos (Fig. 23B) en ratones CB2 KO en comparación a sus controles y además estos ratones presentaron los niveles más altos de estos mediadores oxidativos/nitrosativos de todos los grupos estudiados (Fig. 23 A-B).

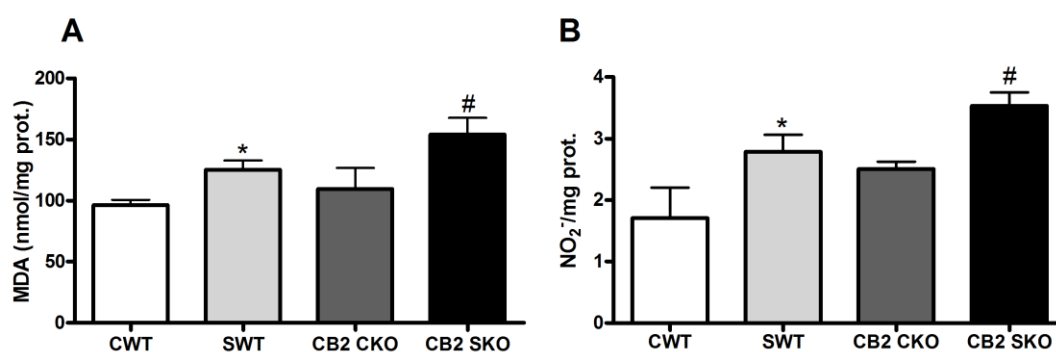


Fig (23) - Niveles de malonildialdehído (MDA) (A) y de NO_2^- (B) en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días (SWT); knock-out para el receptor CB2; knock-out para el receptor CB2 estresados 4 días. Los datos representan la media muestral +EEM (n=6) (* $p<0.05$ vs CWT); (# $p<0.05$ vs SWT) (ANOVA de una vía y post-Test de Newman-Keuls).

Bloque 4

Exposición a estrés repetido y endocannabinoides

4.1 Niveles de endocannabinoides en corteza prefrontal tras estrés repetido

En el siguiente estudio se comprobó el efecto de la exposición a estrés repetido sobre los niveles de los endocannabinoides AEA, 2-AG, PEA y OEA en corteza prefrontal de ratones C57B16, en colaboración con el grupo del Doctor Francis Chaouloff en el Instituto Magendie, INSERM U862, Bordeaux, Francia. Los ratones fueron expuestos a 4 días de estrés y el último día de inmovilización los distintos grupos de animales fueron sacrificados a la hora y tras 2 horas de estrés, respectivamente.

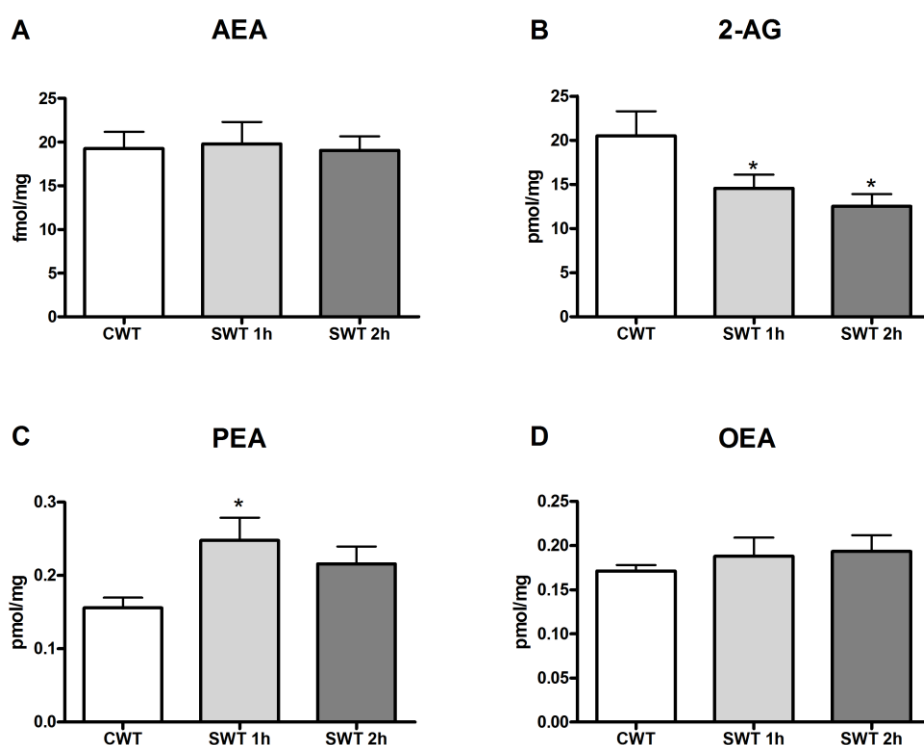


Fig (24) - Niveles de AEA (A), 2-AG (B), PEA (C) y OEA (D) en corteza cerebral de ratones control (CWT); estresados 4 días y sacrificados tras 1 hora de inmovilización (SWT 1h) y estresados 4 días y sacrificados tras 2 horas de inmovilización (SWT 2h). Los datos representan la media muestral +EEM (n=6) (* p<0.05 vs CWT) (ANOVA de una vía y Test de Newman-Keuls).

El estudio mostró cómo la exposición a estrés no provocó modificaciones en los niveles de AEA (Fig. 24A) y OEA (Fig. 24D), mientras que provocó una disminución de los niveles de 2-AG (Fig. 24B) y un aumento de los niveles de PEA tras 1 hora de estrés en la última sesión (Fig. 24C).

4.2 Enzimas de síntesis y degradación endocannabinoide en corteza prefrontal tras estrés repetido

Con objeto de estudiar como el estrés regula las vías de síntesis y degradación de los endocannabinoides examinados, analizamos por Q-PCR los niveles de ARNm de los enzimas de síntesis NAPE-PLD y DAGL- α y de degradación FAAH y MAGL, de AEA y 2-AG, respectivamente. La exposición a estrés no provocó modificaciones en los niveles de ARNm de los enzimas de síntesis NAPE-PLD (Fig. 25A) y de degradación FAAH (Fig. 25B) de AEA; por el contrario el estrés provocó una disminución de los niveles del enzima de síntesis DAGL- α (Fig. 25C) y un aumento en los niveles del de degradación de 2-AG MAGL (Fig. 25D).

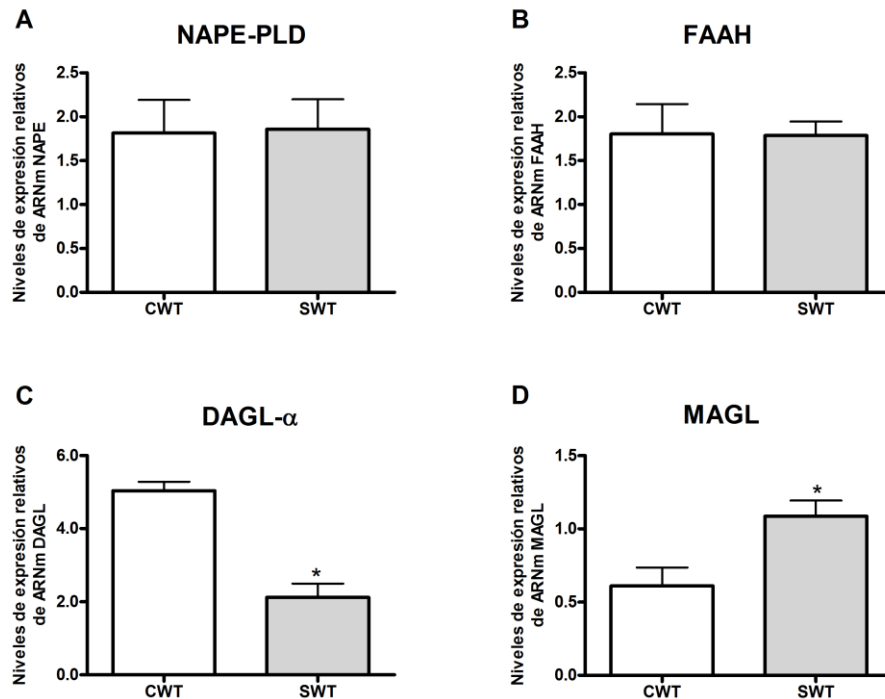


Fig (25) - Análisis Q-PCR de NAPE-PLD (A), FAAH (B), DAGL- α (C) y MAGL (D) en corteza cerebral de ratones control (CWT) y estresados 4 días (SWT). Los datos representan la media muestral +EEM (n=6) (* $p < 0.05$ vs CWT) (T test).

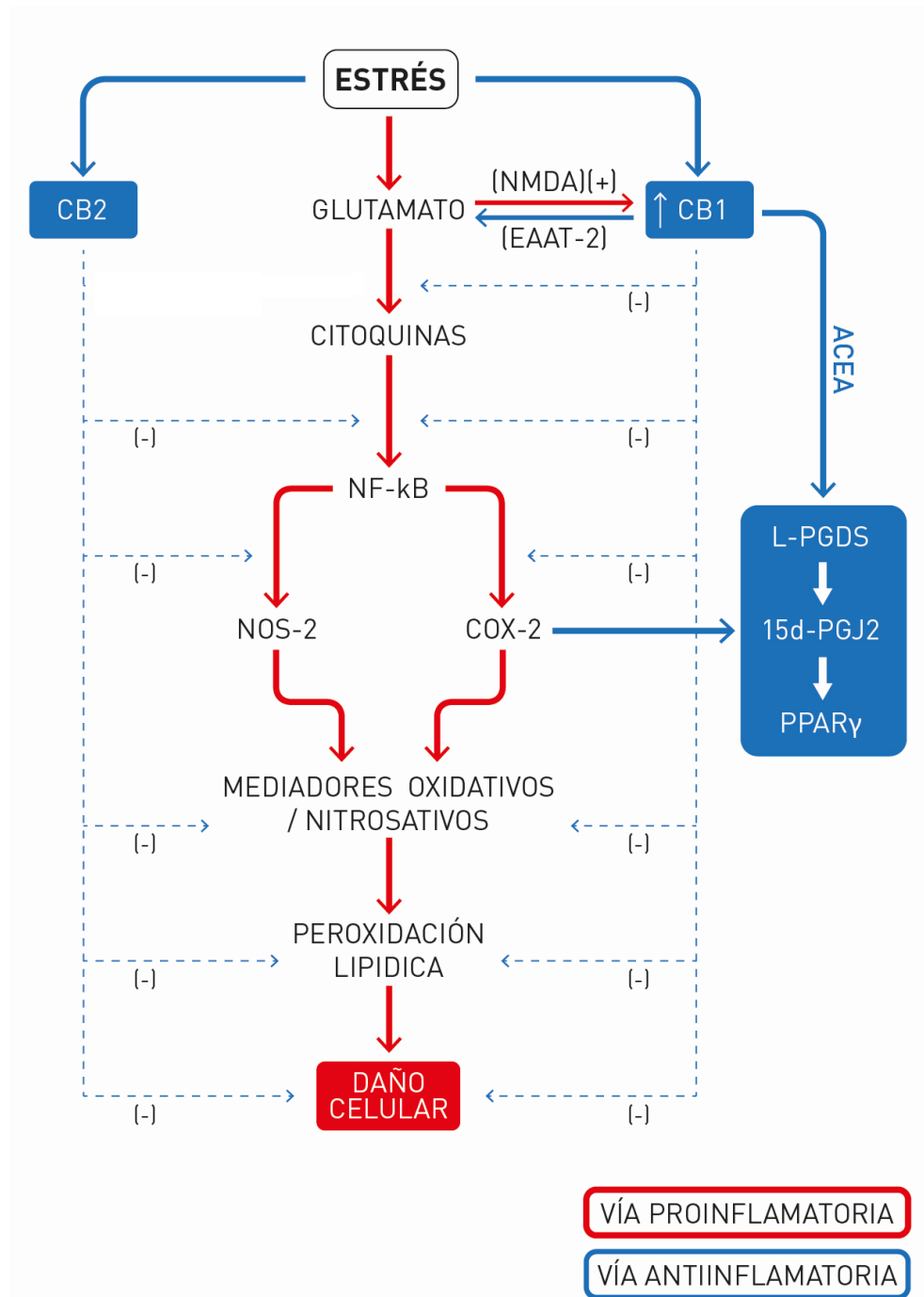


Fig (26) - Vía esquemática del papel regulador de CB1 y CB2 en el proceso excitotóxico y neuroinflamatorio inducido por estrés. NMDA, receptor N-metil-D-aspartato; EAAT-2, transportador de aminoácidos excitadores de tipo II; CB1, receptor cannabinoide 1; NF-kB, factor nuclear kappa B; NOS-2, oxido nítrico sintasa de tipo II; COX-2, ciclooxigenasa de tipo II; L-PGDS, prostaglandina D2 sintasa lipocaina; 15d-PGJ2, 15d-prostaglandina J2; PPAR γ , receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ ; (-) inhibición; (+), estimulación. Rojo, mediadores proinflamatorios. Azul, mediadores antiinflamatorios.

PARTE V

DISCUSIÓN

La exposición a estrés es considerada uno de los factores que contribuyen al daño y a la muerte celular presentes en enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas a través de diversos mecanismos tales como la desregulación del eje HHA, excitotoxicidad y neuroinflamación. Por otro lado, como hemos podido comprobar con esta serie de experimentos, la exposición a estrés activa mecanismos alternativos para contrarrestar estas respuestas, como podría ser la activación del sistema endocannabinoide. De este modo se ha descrito cómo los endocannabinoides son liberados para regular la actividad el eje HHA (Patel y col., 2004; Myers y col., 2012), siendo además capaces de reducir el daño neurodegenerativo e inflamatorio tras diversos estímulos inmunes/inflamatorios y en distintas condiciones patológicas del SNC (Centonze y col., 2008; Santos y col., 2012).

Bloque 1

Papel del receptor cannabinoide CB1 en la neuroinflamación y excitotoxicidad inducidas por estrés

Los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral constituyen la primera evidencia, en nuestro conocimiento, de un incremento del receptor CB1 en la corteza prefrontal de ratones sometidos a estrés por inmovilización en un mecanismo dependiente del receptor glutamatérgico NMDA. El receptor CB1 presenta un perfil anti-excitotóxico, debido a su capacidad de regular el transporte y la recaptación de glutamato tras exposición a estrés, restaurando la expresión del principal transportador de glutamato de origen glial EAAT-2. Además, la activación del receptor CB1 produce efectos antiinflamatorios regulando la respuesta proinflamatoria inducida por el estrés en la corteza prefrontal de ratón. Un posible mecanismo relacionado es la activación/interacción con la vía antiinflamatoria L-PGDS/15d-PGJ₂/PPAR γ .

Numerosos trabajos indican que la actividad del eje HHA, a través de la activación de los receptores glucocorticoides, modula directamente la liberación y/o la actividad de los receptores CB1. Estos efectos han sido observados en corteza prefrontal (Hill y col., 2011), amígdala (Hill y col., 2009b), estriado (Rossi y col., 2008) e hipotálamo (Evanson y col., 2010) de animales estresados, sugiriendo una modulación por parte de la corticosterona sobre la liberación de endocannabinoides. La relación contraria también tendría lugar, ya que los endocannabinoides son liberados para controlar la activación del eje HHA tras estrés (Patel y col., 2004) y el incremento del receptor CB1 tras exposición a estrés en la corteza prefrontal de ratones que aquí se describe podría representar un ejemplo de respuesta protectora en el cerebro.

En relación con nuestros resultados, los endocannabinoides intervienen con un mecanismo receptor CB1-dependiente para regular el mecanismo de feedback a nivel del eje HHA y suprimir la liberación de glutamato y la consecuente estimulación del eje y producción de hormonas corticosteroides (Hill y col., 2011), demostrando que los ratones CB1 KO presentan, tras exposición a estrés, una respuesta del eje HHA (liberación de GCs) exagerada y potencialmente dañina (Barna y col., 2004; Cota y col., 2007).

1.1 Expresión del receptor CB1 en corteza prefrontal de ratones tras estrés. Mecanismos relacionados con el glutamato

Nuestro trabajo coincide con diferentes estudios que atribuyen al receptor CB1 un importante papel como regulador de la neurotransmisión glutamatérgica y de su metabolismo en múltiples neuropatologías (Parmentier-Batteur y col., 2002; Marsicano y col., 2003; Veldhuis y col., 2003; Fernández-López y col., 2006; Kim y col., 2006; Gilbert y col., 2007; Loría y col., 2010). En nuestro contexto, el incremento de CB1 observado tras de la exposición a estrés en la corteza prefrontal de ratones podría representar un mecanismo de compensación con el objetivo de controlar la masiva liberación de glutamato en la hendidura sináptica, que podría producir daño o muerte celular por excitotoxicidad, debido a la sobreactivación de los receptores NMDA (Lowy y col., 1993; Moghaddam y col., 1994; Stein-Behrens y col., 1994). Nuestros resultados muestran que la activación del receptor CB1 por ACEA incrementa el mecanismo de recaptación de glutamato, restaurando la expresión del principal recaptador de glutamato: EAAT-2 de origen glial. Este efecto derivado del agonismo CB1 sobre EAAT-2 ha sido demostrado también en un modelo *in vitro* de esclerosis múltiple (Loría y col., 2010) y después de exposición prenatal de WIN 55,212-2 en corteza frontal de rata (Castaldo y col., 2007). Ha sido ampliamente demostrado que los receptores presinápticos CB1 inhiben la liberación de glutamato, afectando múltiples procesos como la actividad motora, la memoria y la activación del eje HHA (Freund y col., 2003; Chevalleyre y col., 2006; Steiner y Wotjak., 2008).

Nuestros datos sugieren que la neurotransmisión glutamatérgica es regulada también por los receptores CB1 a nivel de los mecanismos de recaptación presináptica de aclarado. Además, resulta interesante que el transportador de glutamato EAAT-2 es un gen diana de PPAR γ , que confiere neuroprotección mediante el incremento de recaptación de glutamato en un modelo *in vitro* de isquemia cerebral (Romera y col., 2007) y tras exposición a estrés (García-Bueno y col., 2007). Además, otro estudio ha identificado los endocannabinoides como agonistas PPAR γ , produciendo neuroprotección mediante un mecanismo EAAT-2 dependiente en un modelo *in vitro* de esclerosis múltiple (Loría y col., 2010).

1.2. Efectos antiexcitotóxicos/antiinflamatorios provocados por la activación del receptor CB1

El conjunto de resultados recogidos en esta Tesis doctoral demuestran que la activación del receptor CB1 modula la respuesta proinflamatoria inducida por estrés a múltiples niveles. En el caso de las citocinas, la activación del receptor CB1 reduce la síntesis de citocinas proinflamatorias como TNF- α y IL-1 β en neuronas, astrocitos y microglía (Maresz y col., 2007; Fernández-López y col., 2006; Marchalant y col., 2009a) e incluso algunos autores han propuesto que hay una regulación recíproca entre las citocinas y el sistema endocannabinoide (Jean-Gilles y col., 2010). De esta forma, también ha sido demostrada la relación opuesta, en la cual las citocinas probablemente estimulan la expresión de los receptores cannabinoides y regulan la actividad de sus enzimas de degradación (Tanasescu y col., 2012) en ciertos escenarios inmunes/inflamatorios (Jean-Gilles y col., 2010). Nuestro modelo de estrés podría ser uno de estos escenarios, en el cual las citocinas son rápidamente producidas y liberadas en la corteza prefrontal del cerebro del ratón. (Madrigal y col., 2002; Lee y col., 2006).

En lo que concierne a otros mediadores proinflamatorios activados por exposición a estrés, como el NF- κ B, nuestros resultados coinciden con otros estudios que muestran que el receptor CB1 tiene un papel en la regulación de NF- κ B en el cerebro de ratón (Panikashvili y col., 2005).

Incluso se ha demostrado que algunos cannabinoides regulan la actividad de NF- κ B a través de mecanismos independientes de los receptores CB1/CB2, como es el caso del cannabidiol en la microglía activada por LPS (Kozela y col., 2010) o el 2-araquidonoilglicerol a través del receptor PPAR γ (Rockwell y col., 2006). NF- κ B induce la expresión de genes responsables de la acumulación de mediadores oxidativos/nitrosativos e inflamatorios que al final contribuyen al daño celular reversible o, en condiciones crónicas, incluso a la muerte celular. Las dos principales fuentes enzimáticas tras estrés en el cerebro son NOS-2 y COX-2. La expresión de NOS-2 disminuye por la activación selectiva de CB1 en neuronas y astrocitos *in vitro* e *in vivo* en modelos de inflamación (Fernández-López y col., 2006; Esposito y col., 2006; Sheng y col., 2005), como en el caso de nuestro estudio con la administración de ACEA.

Sin embargo, las interacciones cannabinoides-ciclooxigenasas parecen ser más complicadas. En nuestro modelo de estrés, el receptor CB1 regula la actividad de COX-2 (síntesis de PGE₂) pero no sus niveles proteicos. Estos resultados sugieren un posible efecto de ACEA en la actividad catalítica o en la estabilidad proteica de la COX-2, o un posible efecto en la actividad de la prostaglandina H sintasa, específica de tejido, posibilidad que necesita ser explorada. Algunos autores han evidenciado protección producida por el 2-araquidonoilglicerol y por el Δ^9 -tetrahidrocannabinol a través de la disminución de la expresión y de la actividad de la COX-2 en cultivos neuronales y en macrófagos J774 estimulados por LPS, mediante un mecanismo CB1-dependiente (Zhang y Chen, 2008; Chang y col., 2001); por el contrario otros indican que el agonista parcial CB1/2 WIN 55,212-2 aumenta la expresión de COX-2 y la liberación de PGE₂ en células endoteliales provenientes de cerebro de ratón tras infección debida al virus de Theiler (Mestre y col., 2006), y es posible que los efectos psicoactivos del THC estén muy relacionados con un aumento de la formación de PGE₂ y a la activación del receptor EP3 en el cerebro (Yamaguchi y col., 2004).

Además, algunos autores señalan que la neurotoxicidad por THC en neuronas de hipocampo es atribuible a la activación de la vías de síntesis de prostanoïdes y a la generación de radicales libres por la ciclooxigenasa, mediante la activación de CB1 (Chan y col., 1998).

La mayoría de los efectos centrales de los cannabinoides se atribuyen a la activación de los receptores CB1/2, pero estudios de inhibición farmacológica en los cuales se había utilizado ratones CB1/2 knock-out sugieren otros posibles mecanismos de acción. De manera interesante, unos posibles candidatos alternativos son los receptores nucleares PPARs, que tienen diferentes cannabinoides como potentes ligandos (O'Sullivan, 2007). En este contexto, los principales endocannabinoides anandamida y 2-araquidonoilglicerol, y también el ácido ajulémico, un análogo estructural del THC, presentan propiedades antiinflamatorias mediadas por PPAR γ . Otros cannabinoides que activan PPAR γ son N-araquidonoil-dopamina, THC, cannabidiol, HU210, WIN55212-2 y CP55940 (Carroll y col., 2012). Los endocannabinoides aciletanolamina, oleiletanolamida y palmitoiletanolamida tienen efectos neuroprotectores mediados por la isoforma PPAR α (Sun y Bennett, 2007; Scuderi y col., 2012) y otros autores han evidenciado como PPAR γ media la inhibición inducida por 2-AG de NF- κ B y de la expresión de COX-2 (Du y col., 2011). Nuestros resultados muestran cambios en la vía antiinflamatoria L-PGDS/15d-PJG $_2$ /PPAR γ tras la delección genética o el bloqueo farmacológico del receptor CB1. Aunque aún no completamente estudiada, la implicación de esta vía antiinflamatoria en los efectos protectores del receptor CB1 merece estudios posteriores. Nuestros resultados indican una significativa activación de la vía L-PGDS/15d-PJG $_2$ /PPAR γ tras administración de ACEA. Esta activación ha sido demostrada también tras administración de ácido ajulémico en células sinoviales humanas (Stebulis y col., 2008).

La regulación de PPARs no está completamente explicada, pero uno de los principales mecanismos podría ser la disponibilidad de ligando (Daynes y Jones., 2008). Este tipo de regulación podría ser importante en nuestro modelo de estrés porque encontramos niveles muy aumentados de 15d-PGJ $_2$ en comparación con los controles. Otros autores han propuesto vías alternativas a través de las cuales los cannabinoides podría activar los receptores PPARs (Sun y Bennett, 2007); la activación del receptor CB1 con ACEA podría estimular la vía MAPK, como ocurre en otros escenarios (Lepicier y col., 2006), siendo MAPK un regulador de la actividad transcriptional PPAR γ mediante fosforilación directa sobre residuos de serina (Burns y Vanden Heuvel, 2007).

1.3 Ratones KO para el receptor CB1. Relación con otros estudios

Nuestros estudios, entre otros, han demostrado una desregulación del eje HHA en condiciones basales y tras estrés en ratones CB1 KO (Barna y col., 2004; Cota y col., 2007; Aso y col., 2008). Además, tras estímulos inmunes/inflamatorios se presenta un estado de excesiva excitotoxicidad (Marsicano y col., 2003) y neuroinflamación, aumentando de este modo la susceptibilidad al desarrollo de daño, como puede ser observado mediante el índice de peroxidación lipídica (niveles de MDA) o incluso muerte celular. En un modelo animal de enfermedad de Parkinson, se ha demostrado una mayor vulnerabilidad a lesiones por 6-hidroxidopamina en ratones sin receptores CB1, que presentan niveles más altos de MDA y de expresión de la proteína NOS-2 en el caudado-putamen y en la corteza cingular en comparación con ratones WT (Pérez-Rial y col., 2011).

Además de una desregulación del eje HHA y de una neuroinflamación crónica, los ratones CB1 KO presentan defectos del proceso de neurogénesis en adultos (Jin y col., 2004), niveles altos de ansiedad (Mikics y col., 2009), defectos de la plasticidad neuronal debido a una reducción de los niveles de BDNF en el hipocampo (Aso y col., 2008), actividad locomotora disminuida (Steiner y col., 1999), reducción de la expresión de los receptores 5-HT_{2C} en diferentes áreas cerebrales (Aso y col., 2009) y diferencias en la reactividad frente a estímulos estresantes en los núcleos del rafe, región cerebral íntimamente relacionada con la depresión (Aso y col., 2011). Debido a estos cambios neuroendocrinos, comportamentales, neuroquímicos y neurovegetativos los ratones CB1 KO han sido propuestos como un modelo animal válido para el estudio de la depresión (Valverde y col., 2011). En un estudio reciente, ha sido analizada la expresión génica de ratones CB1 KO *versus* ratones WT, realizando un *microarray* que revela cómo los ratones CB1 KO presentan en condiciones basales una expresión génica alterada que puede contribuir al fenotipo depresivo y a una reactividad aumentada frente a estímulos estresantes (Aso y col., 2011). Además el receptor CB1 parece estar implicado en el control de la neurotransmisión GABAérgica y en la mediación de los efectos ansiolíticos de las benzodiazepinas; también se ha demostrado que ratones CB1 KO responden disfuncionalmente a los efectos de la administración de fármacos antidepresivos (Uríguen y col., 2004 y 2011).

En resumen, los múltiples efectos aquí descritos sugieren que la activación del receptor CB1 puede representar una nueva estrategia terapéutica contra diferentes patologías del SNC que se asocian a una desregulación del eje HHA y que presentan un componente neuroinflamatorio en su pato-fisiología, como la depresión mayor.

Bloque 2

Papel del receptor cannabinoide CB2 en la neuroinflamación y excitotoxicidad inducidas por estrés

En esta serie de estudios hemos explorado los efectos del tratamiento con el agonista del receptor CB2 JWH-133 así como los efectos de la sobreexpresión y de la ausencia del receptor CB2 en un modelo de excitotoxicidad y neuroinflamación inducidas por estrés, demostrando una menor vulnerabilidad al daño celular tras la activación farmacológica o la sobreexpresión génica del receptor CB2 y una aumentada susceptibilidad a la neuroinflamación inducida por estrés repetido en ratones KO para este receptor. Al contrario que el receptor CB1, el receptor CB2 no parece estar implicado en la regulación de la excitotoxicidad inducida por estrés a través de la modulación del transporte y recaptación de glutamato, ni en la regulación de los niveles plasmáticos de corticosterona.

2.1. Expresión del receptor CB2 en corteza prefrontal tras estrés

La expresión y el posible papel fisiológico del receptor CB2 en neuronas ha sido controvertida (Atwood y col., 2010); numerosos estudios han evidenciado el bajo nivel de expresión de este receptor en el cerebro (Atwood y col., 2010). A nivel transcripcional, el receptor CB2 representa un 5% comparado con la cantidad estimada del receptor CB1 (Onaivi y col., 2008), constituyendo los leucocitos presentes a nivel vascular una porción significativa de su presencia (Atwood y col., 2011). Sin embargo, diferentes estudios han identificado la presencia del receptor CB2 en diferentes áreas cerebrales, incluso tronco cerebral, cerebelo, corteza e hipocampo (Van Sickle y col., 2005; Brusco y col., 2008). La presencia del receptor CB2 en el SNC ya no debería ser tema de controversia (Onaivi y col., 2011).

Los resultados recogidos en esta Tesis Doctoral concuerdan con algunos de estos estudios ya que muestran la presencia del receptor CB2 en corteza prefrontal de ratón en condiciones basales y tras exposición a estrés repetido en neuronas y microglía. De igual modo, se ha demostrado anteriormente que el receptor CB2 se expresa en neuronas (Onaivi y col., 2011), astrocitos (Sheng y col., 2005), oligodendrocitos (Molina-Holgado y col., 2002b) y microglía (Stella, 2004; Cabral y Marciano-Cabral, 2005). En cerebro sano, se ha identificado CB2 en la subpoblación de microglía que rodea los vasos sanguíneos, la llamada microglía perivascular (Núñez y col., 2004). Nuestros resultados no evidencian cambios en la expresión de CB2 a nivel neuronal ni microglial tras estrés repetido. Sin embargo, numerosos estudios demuestran que su expresión aumenta tras daño inmune/neuroinflamatorio y que la activación del receptor CB2 modula la microglía durante los procesos neuroinflamatorios (Maresz y col., 2005; Ruiz-Valdepeñas y col., 2010).

2.2. Efectos antiinflamatorios provocados por la activación del receptor CB2

Nuestros resultados demuestran que la sobreexpresión del receptor CB2 así como su estimulación farmacológica se relacionan con una disminución de los niveles de diferentes mediadores inflamatorios relacionados entre sí, cuyo nivel aumenta por exposición a estrés repetido en corteza prefrontal de ratones, tales como: $\text{TNF-}\alpha$, MCP-1, $\text{NF-}\kappa\text{B}$, NOS-2, COX-2 y PGE_2 . Este efecto antiinflamatorio se correlaciona con una menor peroxidación lipídica y una menor acumulación de metabolitos del NO. Por otro lado, la ausencia del receptor CB2 incrementa los niveles de ciertos parámetros proinflamatorios y la susceptibilidad al daño celular oxidativo/nitrosativo.

Como se comentó anteriormente, el receptor CB1 ha sido directamente implicado en la regulación de la actividad del eje HHA en condiciones basales y de estrés. La exposición a estrés provoca la disminución de los niveles de AEA a nivel de la amígdala, lo que provoca la desinhibición de los impulsos excitatorios hacia el PVN y la consecuente liberación de ACTH y activación el eje HHA (Patel y col., 2004; Steiner y Wotjak 2008).

De esta manera, como confirman nuestros resultados, el bloqueo de los receptores CB1 se relaciona con un incremento de la actividad del eje HHA y niveles aumentados de corticosterona en condiciones basales y tras estrés. Sin embargo, en lo que concierne el receptor CB2, nuestros resultados demuestran que su sobreexpresión genética/activación farmacológica así como su delección genética no modifican el aumento de los niveles de corticosterona inducido por estrés. En relación con estos resultados, otros estudios indican que el aumento de los niveles de corticosterona inducido por endotoxina no se modifica tras administración del agonista no-selectivo CB1/2 HU-210 y por la administración del agonista antagonista/inverso CB2 SR144528 (Roche y col., 2006). Sin embargo, la identificación del ARNm y de la expresión proteica del receptor CB2 en regiones cerebrales que modulan la actividad del eje HHA como el hipocampo, amígdala e hipotálamo (Ashton y col., 2006; Brusco y col., 2008) y su ausencia en glándulas adrenales (Ziegler y col., 2010) sugiere que los ligandos CB2 podrían modular la respuesta neuroendocrina al estrés en el cerebro.

Serán necesarios estudios complementarios para determinar si los receptores CB2 están involucrados de manera endocannabinoide-dependiente en la modulación de la actividad neuroendocrina en condiciones basales y tras protocolos de estrés de distinta naturaleza (físico, psicológico o mixto) tanto en condiciones agudas como crónicas.

En la respuesta general a estrés, uno de los procesos iniciales que tienen lugar es la liberación de aminoácidos excitadores como el glutamato al espacio extracelular (Moghaddam, 1993). Nuestros resultados demuestran que la estimulación genética/farmacológica del receptor CB2, a diferencia de CB1, no está directamente implicada en la regulación de la recaptación de glutamato en sinaptosomas y en la expresión de los transportadores astrogliales de glutamato tras estrés repetido; sin embargo, la estimulación CB2 parece estar asociada a una mayor recaptación sinaptosomal de glutamato en condiciones basales.

Cabe destacar que la activación microglial del receptor CB2 regula los niveles de glutamato a través de la inhibición de TNF- α , citoquina liberada por la microglía activada que provoca el incremento de liberación de glutamato e inhibe su recaptación en astrocitos

(Vesce y col., 2007). Loria y col (2009) demostraron que el inhibidor de recaptación endocannabinoide UCM707 tiene un efecto neuroprotector mediado por CB1/CB2 y posiblemente por PPAR γ , a través de la restauración de la expresión del transportador glial de glutamato EAAT-2 en modelos *in vitro* e *in vivo* de esclerosis múltiple.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el aumento de la concentración de TNF- α es un evento temprano en la respuesta cerebral a estrés por inmovilización (Madrigal y col., 2002); los resultados recogidos en este trabajo muestran una disminución de los niveles de TNF- α y de la quimioquina MCP-1 tras la sobreexpresión genética y la estimulación farmacológica del receptor CB2, en concordancia con otros trabajos donde se ha demostrado que la estimulación del receptor CB2 en células inmunes de cerebro, como en microglia/macrófagos, es capaz de suprimir la liberación de factores proinflamatorios como NO, IL-12, IL-6, TNF- α y especies reactivas del oxígeno (Fernandez-Ruiz y col. 2007; Arévalo-Martín y col., 2008; Cabral y Griffin-Thomas, 2009; Correa y col., 2010) , implicando posiblemente la modulación de la vía Akt-ERK1/2 (Merighi y col., 2012a). Dependiendo del tipo celular, del tiempo transcurrido tras la administración de agonistas CB2 y de la presencia simultánea o no de estímulos inflamatorios, la activación del receptor CB2 puede implicar la activación de las vías PI3K/Akt, ERK 1/2, del lípido pro-apoptótico ceramida o la inhibición de la activación de la NADPH oxidasa (Chung y col., 2012).

La liberación de glutamato y TNF- α tras estrés causa la sobreactivación del factor de transcripción NF- κ B, cuya activación provoca la codificación de proteínas implicadas en el daño oxidativo; nuestros resultados demuestran que el receptor CB2 regula la actividad de NF- κ B y que la modulación genética/farmacológica de CB2 inhibe su activación, mientras que su ausencia la incrementa.

Otros estudios han relacionado la estimulación del receptor CB2 a la inhibición de diferentes genes proinflamatorios entre los cuales se encuentra NF- κ B (Rev. en Docagne y col., 2008). Se ha evidenciado una regulación CB2-dependiente de NF- κ B en diversos tipos de células inmunes, como macrófagos y monocitos (Rajesh y col., 2008) y cómo AEA modula la activación de NF- κ B inducida por LPS inhibiendo la translocación de NF- κ B al núcleo de manera receptor CB2-dependiente mediante activación de las vías ERK1/2 y JNK (Sancho y col., 2003; Nakajima y col., 2006).

NF- κ B induce la síntesis, entre otras moléculas proinflamatorias, de NOS-2, enzima implicado en fenómenos de citotoxicidad en múltiples sistemas celulares y en numerosos procesos patológicos; nuestros resultados evidencian una disminución de la expresión de NOS-2 tras tratamiento con JWH-133 y en ratones que sobreexpresan el receptor CB2.

Coincidiendo con estos resultados, ciertos estudios han demostrado que la administración del agonista CB2 JWH-015 confiere neuroprotección e incrementa la sobrevivencia neuronal en un modelo animal de neurodegeneración a través de la inhibición de la expresión y de la actividad de NOS-2 (Oddi y col., 2012; Pacher y col., 2012); además, a nivel renal se ha demostrado una disminución de estrés oxidativo/nitrosativo y de muerte celular provocados por una atenuación CB2-dependiente de expresión de NOS-2 (Mukhopadhyay y col., 2010).

Otra fuente enzimática estimulada tras exposición a estrés por activación del factor NF- κ B es el enzima COX-2, que produce la prostaglandina proinflamatoria PGE₂, cuya síntesis, aumentada tras estrés repetido, fue inhibida por la activación genética/farmacológica del receptor CB2. En relación a su enzima de síntesis COX-2, nuestros estudios evidencian una reducción en su actividad en ratones que sobreexpresan el receptor CB2, mientras que no se han evidenciado diferencias en la expresión de este enzima tras administración del agonista JWH-133.

La causa de este efecto diferencial podría ser que los ratones transgénicos poseen una mayor expresión del receptor CB2 en las neuronas de la corteza prefrontal pudiendo afectar a la expresión constitutiva de COX-2. Otros autores demuestran una inhibición de la producción de citocinas y de la expresión de COX-2 en un modelo neonatal de hipoxia-isquemia mediante una activación del receptor CB2 por cannabidiol (Castillo y col., 2009).

La activación de los enzimas NOS-2 y COX-2 provoca la acumulación de los mediadores oxidativos/nitrosativos MDA y nitritos; al igual que en otros estudios (Ternianov y col., 2012), nuestros resultados evidencian que la sobreexpresión del receptor CB2, así como su estimulación farmacológica con JWH-133 protege las neuronas del proceso de oxidación y su ausencia incrementa el daño oxidativo inducido por estrés. Los ratones que sobreexpresan el receptor CB2 presentan los niveles más bajos de MDA, sugiriendo que la sobreexpresión de este receptor podría aumentar la capacidad antioxidante celular.

En conclusión, nuestros resultados concuerdan con numerosos estudios que evidencian los efectos neuroprotectores de la estimulación del receptor CB2; la administración de agonistas selectivos para el receptor CB2 confiere neuroprotección en modelos animales de hipoxia y excitotoxicidad (Palazuelos y col., 2006), encefalitis experimental autoinmune (Docagne y col., 2007; Palazuelos y col., 2008), esclerosis lateral amiotrófica (Shoemaker y col., 2007) y la sobreexpresión del receptor CB2 disminuye la extensión del empeoramiento motor, reduce el reclutamiento de astrocitos y microglía a la lesión y disminuye varios parámetros inflamatorios tras la administración intracaudal de 6-hidroxidopamina (Ternianov y col., 2012).

El papel neuroprotector de la activación del receptor CB2 se atribuye a su capacidad de reducir la activación microglial (Maresz y col., 2005; Eljaschewitsch y col., 2006; Palazuelos y col., 2009), aunque otros estudios sugieren que la regulación CB2-mediada de la reactividad astroglial puede contribuir también a la neuroprotección (Docagne y col., 2007; García-Ovejero y col., 2009). En relación a nuestro modelo, la activación genética/farmacológica del receptor CB2 y la consecuente modulación de liberación de citoquinas proinflamatorias se considera como mecanismo protector que limita el daño inducido por la neuroinflamación.

Varios estudios recientes, utilizando agonistas y antagonistas CB2 han evidenciado que la activación del receptor CB2 en el cerebro en condiciones patológicas puede tener importantes consecuencias funcionales en modelos animales de depresión. Ratones transgénicos que sobreexpresan el receptor CB2 muestran disminuidos parámetros depresivos en test comportamentales, niveles aumentados de la expresión de BDNF en el hipocampo (García-Gutiérrez y col., 2010) y menos acumulación de mediadores oxidativos en el cerebro, sugiriendo que la manipulación farmacológica de este receptor puede ser de gran utilidad en trastornos depresivos (García-Gutiérrez y col., 2010).

2.3 Ratones KO para el receptor CB2. Relación con otros estudios

Los resultados recogidos en esta Tesis doctoral muestran que los ratones CB2 KO presentan una mayor susceptibilidad al daño nitrosativo/oxidativo inducido por la exposición a estrés repetido, presentando una mayor acumulación de mediadores proinflamatorios, en concreto de TNF- α , MCP-1, una mayor activación de NF- κ B y niveles aumentados de la prostaglandina proinflamatoria PGE₂ y de los mediadores oxidativo/nitrosativos MDA y nitritos. En concordancia con nuestro trabajo, otros estudios evidencian que los ratones CB2 KO muestran una incrementada susceptibilidad a la neurodegeneración en un modelo experimental de encefalitis-autoinmune (Maresz y col., 2007; Palazuelos y col., 2008) y tras inyección intraestriatal de malonato (Sagredo y col., 2009).

Estudios en ratones CB2 KO han evidenciado que la ausencia del receptor CB2 provoca una serie de respuestas comportamentales disfuncionales, como una disminución de la actividad motora, una falta de adaptación en el test de *Prepulse Inhibition* (PPI) y una mayor vulnerabilidad a estímulos ansiogénicos y depresivos; a causa de estas respuestas los ratones CB2 KO han sido propuestos como modelo animal de estudio de la esquizofrenia (Ortega-Alvaro y col., 2011) y de forma interesante, el análisis del polimorfismo de nucleótidos en el locus del gen del receptor CB2 sugiere una correlación entre una disminuida funcionalidad del receptor CB2 y una aumentada incidencia de esquizofrenia (Ishiguro y col., 2010). Se ha propuesto que la ausencia del receptor CB2 pueda provocar un empeoramiento del desarrollo neuronal, induciendo profundas alteraciones en diferentes áreas neuronales, alteraciones que serían responsables de las modificaciones comportamentales observadas en estos animales, aunque no puede ser excluida la presencia de mecanismos compensatorios (Ortega-Alvaro y col., 2011).

Bloque 3

Exposición a estrés repetido y endocannabinoides

El sistema endocannabinoide regula de forma tónica la actividad del eje HHA y cuando hay una desregulación que sobre-activa el eje los niveles de endocannabinoides se modifican para restaurar el equilibrio (Hill y col., 2010b).

Se han demostrado modificaciones similares regiones-dependiente en los niveles de endocannabinoides en animales sometidos a inmovilización aguda y crónica (Rademacher y col., 2008); esto sugiere la presencia de mecanismos neurobiológicos comunes al origen de tales modificaciones.

Nuestros resultados demuestran que los niveles de AEA no se modifican a nivel de la corteza prefrontal tras estrés repetido, al igual que ocurre con los niveles estables de sus enzimas de síntesis y degradación NAPE-PLD y FAAH, respectivamente. Este resultado podría indicar que la corteza prefrontal no es el área directamente implicada en la regulación de la actividad del eje HHA a través de la señalización por AEA. Sin embargo, no pueden excluirse modificaciones de AEA en otras estructuras cerebrales implicadas en la regulación de la actividad del eje HHA; se ha demostrado que la administración de antagonistas CB1 a nivel del núcleo basolateral de la amígdala y no a nivel de la corteza prefrontal, aumenta la actividad del eje HHA en animales no estresados (Ganon-Elazar y Akirav, 2009; Hill y col., 2009a y 2011) y se ha identificado la amígdala basolateral como región responsable de la regulación del eje HHA a través de un mecanismo AEA-dependiente (Rademacher y col., 2008; Hill y col., 2009b). De hecho, el contenido de AEA en la amígdala se correlaciona negativamente con la secreción de glucocorticoides (Bowles y col., 2012), que a su vez estimulan la actividad de la enzima de degradación FAAH y la disminución de AEA (Hill y Tasker., 2012), siendo esta disminución la responsable del desencadenamiento de impulsos excitatorios hacia el PVN y de la activación del eje HHA (Patel y col., 2005).

Nuestros resultados evidencian que la exposición a estrés repetido provocó una disminución de 2-AG en corteza prefrontal, paralelamente a una disminución de ARNm de su enzima de síntesis DAGL- α y a un aumento de ARNm de su enzima de degradación MAGL.

Ha sido demostrado que MAGL se localiza fundamentalmente a nivel presináptico junto a los receptores CB1 (Kano y col. 2009; Keimpena y col., 2010) y que la corteza prefrontal y el hipocampo regulan la actividad del eje HHA mediante activación de proyecciones glutamatérgicas que estimulan las proyecciones inhibitorias de la estría terminal hacia el PVN disminuyendo la activación del eje HHA (Radley y Sawchenko, 2011); en este sentido, la disminución de 2-AG podría contribuir a la activación del eje HHA tras estrés repetido.

Es de reseñar que otros autores describen que los niveles de 2-AG aumentan tras exposición a estrés; sin embargo, 2-AG es reclutado vía GCs para terminar la activación del eje HHA tras la desaparición del estímulo estresante (Hill y Tasker., 2011). Se ha demostrado que mientras las concentraciones de AEA se modifican durante el estrés mismo, los niveles de 2-AG se incrementan más tarde, durante la fase de recuperación (Hillard y col., 2012). Esta diferencia con nuestros resultados podría explicarse con un papel temporalmente y estructuralmente específico de la señal endocannabinoide en fases distintas del *feedback* negativo glucocorticoide a nivel del PVN y posiblemente de la amígdala. En estas estructuras se produce una rápida inducción de la actividad endocannabinoide mediante un mecanismo no-genómico de los glucocorticoides que contribuye a la inhibición del eje HHA en una fase temprana de la respuesta neuroendocrina a estrés (Di y col., 2003; Evanson y col., 2010); por otro lado, a nivel de la corteza prefrontal y posiblemente del hipocampo, un aumento a plazo más largo de la actividad endocannabinoide mediante mecanismos que involucran acciones genómicas de los GCs, contribuye a la inhibición del circuito glucocorticoide y a la terminación de la respuesta al estrés, posiblemente a través de una inhibición glucocorticoide-dependente de la actividad de MAGL (Hill y col., 2011). Además se ha demostrado que los niveles de 2-AG aumentan en corteza prefrontal tras exposición a estrés homotípico repetido como respuesta adaptativa frente al estímulo estresante, para proteger contra los efectos deletéreos de una activación prolongada del eje HHA y de niveles

elevados de GCs (Patel y col., 2009); sin embargo, la disminución de 2-AG a nivel de la corteza prefrontal que evidencian nuestros resultados podría indicar una desregulación de este mecanismo de feedback inhibitorio del eje HHA y una falta de adaptación tras exposición a estrés repetido, como demuestran estudios de inmovilización asociados a ultrasonidos que impiden la adaptación del animal al estrés (Kiank y col., 2006). De forma interesante, en estudios de CMS, donde la adaptación no ocurre típicamente, se demuestra una pérdida de señalización de 2-AG a nivel del circuito cortico-límbico que se relaciona con un empeoramiento cognitivo (Hill y col., 2005). Pacientes con diagnóstico de depresión mayor presentan niveles disminuidos séricos de 2-AG, paralelamente a una desregulación del eje HHA, que son directamente proporcionales a la duración del episodio depresivo (Hill y col., 2009).

Un estudio reciente ha demostrado que la metabolización de 2-AG por el enzima MAGL representa el sustrato necesario para la formación de prostaglandinas proinflamatorias; la inactivación farmacológica/genética de MAGL provoca el bloqueo del incremento de citoquinas y la activación de microglía inducidas por LPS (Nomura y col., 2011), evidenciando que el enzima MAGL relaciona el sistema endocannabinoide a la formación de prostaglandinas implicadas en la reacción neuroinflamatoria cerebral inducida por estrés (Giuffrida y col., 2012). Este estudio concuerda con nuestros resultados, donde demostramos una disminución de 2-AG por aumentada actividad de MAGL y, paralelamente, un aumento de distintas prostaglandinas implicadas en el proceso neuroinflamatorio cerebral inducido por estrés, como la PGE₂.

Además, en nuestro modelo aumenta la expresión del receptor CB1; es posible que la disminución de 2-AG esté implicada en la sobrerregulación de CB1, cuya expresión aumenta como posible mecanismo compensatorio para contrarrestar el daño excitotóxico inducido por la exposición a estrés repetido.

Nuestros resultados también indican que la exposición a estrés repetido provoca un aumento de los niveles de PEA.

En relación a otros estudios, en varios modelos *in vivo* y *in vitro*, el incremento de PEA inducido por excitotoxicidad y daño neuronal ha sido asociado a un papel neuroprotector y homeostático (Barbero y col., 2007).

Se ha demostrado que la microglía sintetiza y metaboliza PEA, que a través de la modulación de diferentes células inmunes *in vitro* e *in vivo*, disminuye la liberación de diferentes mediadores inflamatorios como histamina, TNF- α y prostaglandinas (Cerrato y col., 2010; Costa y col., 2011). En los últimos años varios estudios han evidenciado que PEA interviene en el control de la microglía activada (Luong y col., 2011), en la modulación de células inflamatorias (Esposito y col., 2011), siendo su más importante diana biológica el receptor PPAR- α (Lo Verme y col., 2005), que al igual que la isoforma PPAR- γ podría verse activada tras la exposición a estrés. En este sentido, el aumento de PEA podría contribuir a la activación de esta vía para restaurar la homeostasis y evitar los efectos dañinos de una exposición prolongada a estrés.

Por último, hemos demostrado que la exposición a estrés repetido no modifica los niveles de OEA en corteza prefrontal tras estrés repetido; al igual que ocurría con los niveles estables de AEA.

Los estudios realizados sobre las vías de síntesis y degradación de estas N-aciletanolaminas sugieren que en el cerebro esta familia comparte las mismas vías bioquímicas (Cravatt y col., 2001; Patel y col., 2005a). Por el contrario, hemos demostrado que los niveles de PEA aumentan tras estrés repetido; esta discrepancia podría ser debida a distintas vías de metabolización de estas aciletanolaminas; mientras que AEA y OEA son degradados preferentemente por FAAH, PEA es hidrolizada por una N-aciletanolamina amidasa (Tsuboi y col., 2005; Loria y col., 2008).

En resumen, los resultados recogidos en esta Tesis apoyan la idea de que los receptores cannabinoides CB1 y CB2 representan una atractiva diana para el desarrollo de nuevas farmacoterapias útiles en el tratamiento de neuropatologías asociadas a neuroinflamación. Hemos comprobado que el receptor CB1 es activado principalmente para frenar la actividad del eje HHA a corto plazo regulando la liberación de glutamato y limitando la activación de la consecuente cascada neuroinflamatoria, posiblemente implicando también la activación de otras vías antiinflamatorias como la L-PGDS/15d-PJG₂/PPAR γ .

Por otro lado, el receptor CB2 se activa principalmente a nivel microglial regulando la liberación de diferentes citocinas implicadas en la neuroinflamación, aunque no pueden excluirse otros efectos protectores CB1/CB2-independientes debido a la naturaleza lipófila y antioxidante de los endocannabinoides y otras moléculas relacionadas como las aquí utilizadas. Ulteriores estudios son necesarios para estudiar los efectos indeseados de la activación prolongada y generalizada de estos receptores; la amplia distribución anatómica del receptor CB1 a nivel central y también periférico y su participación en la regulación de diversas funciones fisiológicas básicas pueden limitar su aplicación terapéutica por la presencia de efectos adversos (Lazary y col., 2011; Moreira y Wotjak, 2010; Seely y col., 2011); al contrario, la activación el receptor CB2, siendo inducible durante estados patológicos y expresándose y activándose en el área afectada por el daño, disminuye la posibilidad de efectos secundarios (Atwood, 2012).

En ciertas condiciones, el efecto neuroprotector de los cannabinoides requiere la co-activación de ambos receptores CB1 y CB2 (Docagne y col., 2007; Molina-Holgado y col., 2005; Fernández-López y col., 2006), lo que haría el tratamiento sólo basado en CB2 menos eficaz. Por estas razones, una nueva y prometedora estrategia terapéutica consiste en el aumento del tono endocannabioide en los tejidos dañados, en lugar de la aplicación de cannabinoides exógenos.

El bloqueo de la degradación de endocannabinoides está emergiendo como una herramienta útil para el tratamiento de trastornos depresivos y ansiedad. La inhibición farmacológica de esta degradación permite aumentar los efectos beneficiosos de la acción directa de los agonistas cannabinoides y simultáneamente de reducir los efectos secundarios (Petrosino and Di Marzo, 2010); como los endocannabinoides son sintetizados a demanda, el bloqueo de su degradación prolonga la acción de los endocannabinoides solo en las áreas donde están endógenamente activados, evitando su activación generalizada (Pan y col., 2009; Häring y col., 2012); además el bloqueo de la degradación endocannabinoide provoca un efecto neuroprotector disminuyendo los niveles de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega-6 (ácido araquidónico) y de prostaglandinas proinflamatorias (Nomura y col., 2011).

En conclusión, nuestros resultados muestran la importancia del papel del sistema cannabinoide en la regulación de la neuroinflamación inducida por estrés y que el sistema endocannabinoide interviene como sistema endógeno neuroprotectivo en el control de la homeostasis en la respuesta a estrés mediante la activación de los receptores CB1 y CB2.

PARTE VI

CONCLUSIONES

Conclusions

The studies enclosed in this thesis have shown that:

1. Stress exposure induced CB1 expression in prefrontal cortex in a mechanism dependent on NMDA glutamate receptors.
2. CB1 receptor activation with ACEA inhibits the stress-induced glutamate uptake downregulation mechanism, by restoring protein expression of the glutamate transporter EAAT2. Conversely CB1 KO mice showed dramatically reduced glutamate transport.
3. The selective CB1 receptor agonist ACEA prevented stress induced proinflammatory mediator overaccumulation in the prefrontal cortex of WT mice, whereas CB1 KO mice presents an aggravated excitotoxic/neuroinflammatory process in basal conditions and after stress exposure.
4. CB1 pharmacological manipulation induces changes in the antinflammatory pathway L-PGDS/15d-PGJ₂/PPAR γ , increasing L-PGDS and PPAR γ expression in prefrontal cortex mice compared with their controls after stress.
5. The overexpression of CB2 receptor and administration of the selective CB2 receptor agonist JWH-133 administration prevented stress induced proinflammatory mediators overaccumulation in the prefrontal cortex of WT mice. Conversely, CB2 KO mice presented an aggravated neuroinflammatory process in basal conditions and after stress exposure. The observed anti-inflammatory effects of CB2 activation were not related to modifications in glutamate transport and metabolism and to changes on corticosterone plasma levels.

6. Stress exposure enhanced PEA content and decreased 2-AG content within the prefrontal cortex, possibly due to differences in the expression of its degradation and biosynthetic enzymes, but had no effect on AEA and OEA levels.
7. In summary, the neuroprotective effects described here suggest that CB1/CB2 activation is an attractive therapeutic strategy against diverse neuropsychiatric pathologies with HPA axis dysregulation and an neuroinflammatory component in their pathophysiology.

Bibliografia

- Abadji V, Lin S, Taha G, Griffin G, Stevenson LA, Pertwee RG, Makriyannis A. 1994. (R)-methanandamide: a chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability. *J Med Chem.* 37(12):1889-93.
- Abrahám I, Veenema AH, Nyakas C, Harkany T, Bohus BG, Luiten PG. 1997. Effect of corticosterone and adrenalectomy on NMDA-induced cholinergic cell death in rat magnocellular nucleus basalis. *J Neuroendocrinol.* 9:713-20.
- Abush H, Akirav I. 2010. Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. *Hippocampus.* 10:1126-38.
- Achiron A., Miron S., Lavie V., Margalit R. and Biegon A.. 2000. Dexanabinol (HU-211) effect on experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the treatment of acute relapses of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 102, pp. 26–31.
- Adams R, Baker BR, Wearn RB. *Structure of cannabinol III.* 1940a. Synthesis of cannabinol, 1-hydroxy-3-n-amy-6-6-9-trimethyl-6-dibenzopyran. *J Am Chem Soc.*, 62:2204-7.
- Adams R, D. C. Pease, C. K. Cain, J. H. Clark. 1940b. Isomerization of Cannabidiol to Tetrahydrocannabinol, a Physiologically Active Product. Conversion of Cannabidiol to Cannabinol. *J. Am. Chem. Soc.*, 62 (9), pp 2402–2405.
- Adhikary S, Li H, Heller J, Skarica M, Zhang M, Ganea D, Tuma. 2011. Modulation of Inflammatory Responses by a Cannabinoid-2-Selective Agonist after Spinal Cord Injury. *RFJ Neurotrauma.*
- Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh. 2005. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *IFASEB J.* 19(12):1704-6.
- Ahn, K.,Mckinney,M.K.,andCravatt, B.F. 2008. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem. Rev.* 108, 1687–1707
- Akirav I. 2011. The role of cannabinoids in modulating emotional and non-emotional memory processes in the hippocampus. *Front Behav Neurosci.* 5:34.
- Alves F. H., Crestani C. C., Gomes F. V., Guimaraes F. S., Correa F. M., Resstel L. B. 2010. Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis modulates baroreflex activity through 5-HT1A receptors. *Pharmacol. Res.* 62, 228–236.
- Anacker C, Zunszain PA, Cattaneo A, Carvalho LA, Garabedian MJ, Thuret S, Price J, Pariante CM. 2011. Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor. *Mol Psychiatry.* 16(7):738-50.
- Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, Pariante CM. 2011b. The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment?. *Psychoneuroendocrinology.* 36(3):415-25.
- Andre, A. and Gonthier, M.P. 2010. The endocannabinoid system: its role sinenergy balance and potential as a target for obesity treatment. *Int. J. Biochem.CellBiol.* 42, 1788–1801.
- Angelucci F, Brenè S, Mathé. 2005. AA BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry.* Apr;10 (4):345-52. Review

- Anisman H. 2009. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci.* 34(1):4-20. Review
- Arévalo-Martín A, Vela JM, Molina-Holgado E, Borrell J, Guaza C. 2003. Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci.* 23(7):2511-6.
- Arévalo-Martín A, García-Ovejero D, Rubio-Araíz A, Gómez O, Molina-Holgado F, Molina-Holgado E. 2007. Cannabinoids modulate Olig2 and polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the subventricular zone of post-natal rats through cannabinoid receptor 1 and cannabinoid receptor 2. *Eur J Neurosci.* 26(6):1548-59.
- Armario A, Gil M, Marti J, Pol O, Balasch J. 1991. Influence of various acute stressors on the activity of adult male rats in a holeboard and in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav.* 39(2):373-7.
- Arnold JC, Boucher AA, Karl T. 2012. The Yin and Yang of Cannabis-induced Psychosis: the Actions of $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol in Rodent Models of Schizophrenia. *Curr Pharm Des.* Jun 6.
- Arnsten AF. 2009. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci.* 10(6):410-22. Review.
- Ashton, D. Friberg, C.L. Darlington and P.F. Smith. 2006. Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* 396,pp. 113–116.
- Ashton JC, Glass M. 2007. The Cannabinoid CB2 Receptor as a Target for Inflammation-Dependent Neurodegeneration. *Curr Neuroparmacol.* 5(2):73-80.
- Ashton, R.M.A. Rahman, S.M. Nair, B.A. Sutherland, M. Glass and I. Appleton. 2007. Cerebral hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion induce expression of the cannabinoid CB2 receptor in the brain. *Neurosci. Lett.*, 412, pp. 114–117.
- Aso E, Ozaita A, Valdizán EM, Ledent C, Pazos A, Maldonado R, Valverde O. 2008. BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. *J Neurochem* 105:565–572.
- Aso E, Renoir T, Mengod G, Ledent C, Hamon M, Maldonado R, Lanfumey L, Valverde O. 2009. Lack of CB1 receptor activity impairs serotonergic negative feedback. *J Neurochem.* 109(3):935-44.
- Aso E, Ozaita A, Serra MÀ, Maldonado R. 2011. Genes differentially expressed in CB1 knockout mice: involvement in the depressive-like phenotype. *Eur Neuropsychopharmacol.* 21(1):11-22.
- Atwood BK and Mackie K. 2010. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br J Pharmacol.* 160: 467-479.
- Atwood BK, Straiker A, Mackie K. 2011. CB (2): Therapeutic target-in-waiting. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*
- Axelrod, J. y Reisine, T. D. 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224: 452-459.
- Bahr BA, Karanian DA, Mankanji SS, Makriyannis A. 2006. Targeting the endocannabinoid system in treating brain disorders. *Expert Opin Investig Drugs.* 15(4):351-65.
- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR.(2006) In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Jan;27(1):1-4.
- Balenga NA, Henstridge CM, Kargl J, Waldhoer. 2011. M Pharmacology, Signaling and Physiological Relevance of the G Protein-coupled Receptor 55. *Adv Pharmacol.* 62:251-77.
- Baldwin, A. S. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.* 14: 649-683
- Bambico FR, Cassano T, Dominguez-Lopez S, Katz N, Walker CD, Piomelli D, Gobbi G. 2010. Genetic deletion of fatty acid amide hydrolase alters emotional behavior and serotonergic

- transmission in the dorsal raphe, prefrontal cortex, and hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 35(10):2083-100.
- Barna I, Zelena D, Arszovszki AC, Ledent C. 2004. The role of endogenous cannabinoids in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis regulation: in vivo and in vitro studies in CB1 receptor knockout mice. *Life Sci*. 75(24):2959-70.
- Basu-Modak S, Braissant O, Escher P, Desvergne B, Honegger P, Wahli W. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor beta regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures. *J Biol Chem*, 274(50):35881-8.
- Baty DE, Zhang M, Li H, Erb CJ, Adler MW, Ganea D, Loftus CM, Jallo JI, Tuma. 2008. Cannabinoid CB2 receptor activation attenuates motor and autonomic function deficits in a mouse model of spinal cord injury *Clin Neurosurg*;55:172-7.
- Baum, A. y Posluszny, D. M. 1999. Health psychology: mapping biobehavioral contributions to health and illness. *Annu.Rev.Psychol*. 50: 137-163.
- Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Barg J, Mechoulam R, Vogel Z. 1995. The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett*. 13;375(1-2):143-7.
- Bazan NG, Marcheselli VL, Cole-Edwards K. 2005. Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 1053:137-47. Review.
- Begg M, Pacher P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Offertáler L, Mo FM, Liu J, Kunos G. 2005. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther*. 106(2):133-45.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. 1997. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, 277:1094-1097.
- Benito C, Núñez E, Tolón RM, Carrier EJ, Rábano A, Hillard CJ, Romero J. 2003. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci*. (35):11136-41.
- Benito C, Romero JP, Tolón RM, Clemente D, Docagne F, Hillard CJ, Guaza C, Romero J. 2007. Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis. *J Neurosci*. 27(9):2396-402.
- Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V, Mechoulam R. 1998. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol*, 353(1):23-31.
- Bernardo A, Minghetti L. 2008. Regulation of Glial Cell Functions by PPAR-gamma Natural and Synthetic Agonists. *PPAR Res*. 864140.
- Berton O, Nestler EJ. 2006. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 7:137–151.
- Beyer CE, Dwyer JM, Piesla MJ, Platt BJ, Shen R, Rahman Z, Chan K, Manners MT, Samad TA, Kennedy JD, Bingham B, Whiteside GT. 2010. Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. *Neurobiol Dis*. 39:148155.
- Bisogno T, Melck D, Bobrov MYu, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, Di Marzo V. 2000. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J*, 351 Pt 3:817-24.
- Bisogno T, Maccarrone M, De Petrocellis L, Jarrahian A, Finazzi-Agrò A, Hillard C, Di Marzo V. 2001. The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem*. 268:1982-1989.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano- Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P. 2003. Cloning of the first

- sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol.* 163:463-468.
- Bloss EB, Janssen WG, McEwen BS, Morrison JH. 2010. Interactive effects of stress and aging on structural plasticity in the prefrontal cortex. *J Neurosci.* 30:6726-6731.
- Borsook D, Hyman SE. 1995. Proenkephalin gene regulation in the neuroendocrine hypothalamus: a model of gene regulation in the CNS. *Am J Physiol.* 269(3 Pt 1):E393-408. Review.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrié B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J.* 312 (Pt 2):637-41.
- Bouaboula M, Perrachon S, Milligan L, Canat X, Rinaldi-Carmona M, Portier M, Barth F, Calandra B, Pecceu F, Lupker J, Maffrand JP, Le Fur G, Casellas P. 1997. A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *J Biol Chem.* 272(35):22330-9.
- Bouaboula M, Hilairt S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P. 2005. Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol.* 517(3):174-81.
- Bowles NP, Hill MN, Bhagat SM, Karatsoreos IN, Hillard CJ, McEwen BS. 2012. Chronic, noninvasive glucocorticoid administration suppresses limbic endocannabinoid signaling in mice. *Neuroscience.* 204:83-9.
- Bremner JD, Licinio J, Darnell A, Krystal JH, Owens MJ, Southwick SM, Nemeroff CB, Charney DS. 1997. Elevated CSF corticotropin-releasing factor concentrations in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry.* 154(5):624-9.
- Bremner JD. Alterations in brain structure and function associated with post-traumatic stress disorder. 1999. *Semin Clin Neuropsychiatry.* (4):249-55. Review.
- Brusco A Tagliaferro P, Saez T Onaivi ES. 2008. Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. *Synapse.* 62:944-949.
- Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, Glass M, Zimmer A. 2000. Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol.* 396(2-3):141-9.
- Burns KA, Vanden Heuvel JP. 2007. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 1771(8):952-60. Review.
- Burstein S, Budrow J, Debatis M, Hunter SA, Subramanian A. 1994. Phospholipase participation in cannabinoid-induced release of free arachidonic acid. *Biochem Pharmacol.* 48(6):1253-64.
- Burt DB, Zembar MJ, Niederehe G. 1995. Depression and memory impairment: a meta-analysis of the association, its pattern, and specificity. *Psychol Bull.* 117(2):285-305.
- Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. 2009. *Neurosci Biobehav Rev.* Jul; 33(7):1089-98.
- Cabral GA, Marciano-Cabral F. 2005. Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. *J Leukoc Biol.* (6):1192-7.
- Cabral GA, Griffin-Thomas L. 2009. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev Mol Med.* 11: e3. Review.
- Calignano A, La Rana G, Piomelli D. 2001. "Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide". *Eur J Pharmacol.* 419 (2-3): 191-8.

- Cameron, H.A. & Gould, E. 1994. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience*, 61, 203–209.
- Cameron, H.A., Tanapat, P. & Gould, E. 1998. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience*, 82, 349–354.
- Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA. 2002. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol.* 2(1):69-82.
- Carroll, B. J., Cassidy, F., Naftolowitz, D., Tatham, N. E., Wilson, W. H., Iranmanesh, A., Liu, P. Y., y Veldhuis, J. D. 2007. Pathophysiology of hypercortisolism in depression. *Acta Psychiatr.Scand.Suppl* 90-103
- Carroll CB, Zeissler ML, Hanemann CO, Zajicek JP. 2012. $\Delta(9)$ -THC exerts a direct neuroprotective effect in a human cell culture model of Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.*
- Castaldo P, Magi S, Gaetani S, Cassano T, Ferraro L, Antonelli T, Amoroso S, Cuomo V. 2007. Prenatal exposure to the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 increases glutamate uptake through overexpression of GLT1 and EAAC1 glutamate transporter subtypes in rat frontal cerebral cortex. *Neuropharmacology.* 53(3):369-78.
- Castillo A, Tolón MR, Fernández-Ruiz J, Romero J, Martínez-Orgado J. 2009. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiol Dis.* 37(2):434-40.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653):816-24.
- Centonze D, Battistini L, Maccarrone. 2008. The endocannabinoid system in peripheral lymphocytes as a mirror of neuroinflammatory diseases. *M. Curr Pharm Des.* 2008; 14 (23):2370-42.
- Chakrabarti A, Onaivi ES, Chaudhuri G. 1995. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein. *DNA Seq.* 5(6):385-8.
- Chang YH, Lee ST, Lin WW. 2001. Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. *J Cell Biochem.* 81(4):715-23.
- Chan GC, Hinds TR, Impey S, Storm DR. 1998. Hippocampal neurotoxicity of Delta9-tetrahydrocannabinol. *J Neurosci.* 18(14):5322-32.
- Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E, Chrousos GP. 2003. Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Horm Res.* 59(4):161-79. Review.
- Chen Y, McCarron RM, Ohara Y, Bembry J, Azzam N, Lenz FA, Shohami E, Mechoulam R, Spatz M. 2000. Human brain capillary endothelium: 2-arachidonoglycerol (endocannabinoid) interacts with endothelin-1. *Circ Res.* 87(4):323-7.
- Chin CL, Tovcimak AE, Hradil VP, Seifert TR, Hol-lingsworth PR, Chandran P, Zhu CZ, Gauvin D, Pai M, Wetter J, Hsieh GC, Honore P, Frost JM, Dart MJ, Meyer MD, Yao BB, Cox BF, Fox GB. 2008. Differential effects of cannabinoid receptor agonists on regional brain activity using pharmacological MRI. *Br. J. Pharmacol.* 153:367–379.
- Childers SR, y DeadwylerSA. 1999. Role of Cyclic AMPc in the actions of cannabinoid receptor. *Biochem Pharmacol.* 52: 819-27.
- Chang YH, Lee ST, Lin WW. 2001. Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. *J Cell Biochem.* 81(4):715-23.
- Chevalleyre V, Takahashi KA, Castillo PE. 2006. Endocannabinoidmediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci*; 29: 37-76.

- Chrousos GP, Gold PW. 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*. 267(9):1244-52. Review. Erratum in: *JAMA* 1992 Jul 8; 268(2):200.
- Chou YC, Lin WJ, Sapolsky RM. 1994. Glucocorticoids increase extracellular [3H]D-aspartate overflow in hippocampal cultures during cyanide-induced ischemia. *Brain Res*. 654(1):8-14.
- Chung ES, Bok E, Chung YC, Baik HH, Jin BK. 2012. Cannabinoids prevent lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat substantia nigra in vivo through inhibition of microglial activation and NADPH oxidase. *Brain Res*. 1451:110-6.
- Coe CL, Kramer M, Kirschbaum C, Netter P, Fuchs E. 2002. Prenatal stress diminishes the cytokine response of leukocytes to endotoxin stimulation in juvenile rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*. 87(2):675-81.
- Cohen-Yeshurun A, Trembovler V, Alexandrovich A, Ryberg E, Greasley PJ, Mechoulam R, Shohami E, Leker RR. 2011. N-arachidonoyl-L-serine is neuroprotective after traumatic brain injury by reducing apoptosis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 31(8):1768-77.
- Cole MA, Kim PJ, Kalman BA, Spencer RL. 2000. Dexamethasone suppression of corticosteroid secretion: evaluation of the site of action by receptor measures and functional studies. *Psychoneuroendocrinology* 25:151-167.
- Conrad CD, LeDoux JE, Magariños AM, McEwen BS. 1999. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav Neurosci*. 113(5):902-13.
- Cook SC, Wellman CL. 2004. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol*. 60(2):236-48.
- Correa F, Mestre L, Docagne F, Guaza C. 2005. Activation of cannabinoid CB2 receptor negatively regulates IL-12p40 production in murine macrophages: role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling. *Br J Pharmacol*. 145(4):441-8.
- Correa F, Hernangómez M, Mestre L, Loria F, Spagnolo A, Docagne F, Di Marzo V, Guaza C. 2010. Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB(2) receptors: roles of ERK1/2, JNK, and NF-kappaB. *Glia*. 58(2):135-47.
- Cota D, Marsicano G, Lutz B, Vicennati V, Stalla GK, Pasquali R, Pagotto U. 2003. Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *Int J Obes Relat Metab Disord*. (3):289-301. Review.
- Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. 2003. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest*. 112(3):423-31.
- Cota D. 2007. CB1 receptors: emerging evidence for central and peripheral mechanisms that regulate energy balance, metabolism, and cardiovascular health. *Diabetes Metab Res Rev*. 23(7):507-17. Review.
- Cota D. 2008. The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol*. 20 Suppl 1:35-8. Review.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 384(6604):83-7.
- Cristiano L, Bernardo A, Cerù MP. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and peroxisomes in rat cortical and cerebellar astrocytes. *J Neurocytol*. 30(8):671-83.

- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V. 2006. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, 139(4):1405-15.
- Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S, Dolphin CT, Patel R, Clark JB. 1998. Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem*, 70(4):1366-75.
- Czéh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E. 2001. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci*. 98(22):12796-801.
- Czéh B, Perez-Cruz C, Fuchs E, Flügge G. 2008. Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? *Behav Brain Res*. 190(1):1-13. Review.
- D'Agostino G, La Rana G, Russo R, Sasso O, Iacono A, Esposito E, Mattace Raso G, Cuzzocrea S, Loverme J, Piomelli D, Meli R, Calignano A. 2009. Central administration of palmitoylethanolamide reduces hyperalgesia in mice via inhibition of NF-kappaB nuclear signalling in dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol*. 613(1-3):54-9.
- Das NP, Ratty AK. 1987. Studies on the effects of the narcotic alkaloids, cocaine, morphine, and codeine on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria. *Biochem Med Metab Biol*. 37(2):258-64.
- David, D.J., Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.-W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D.A., Guiard, B.P., Guilloux, J.-P., Artymyshyn, R.P., Gardier, A.M., Gerald, C., Antonijevic, I.A., Leonardo, E.D. & Hen, R. 2009. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*, 62, 479–493.
- Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. 2002. *Nat Rev Immunol*. 2(10):748-59. Review.
- Den Boer JA. 1998. Pharmacotherapy of panic disorder: differential efficacy from a clinical viewpoint. *J Clin Psychiatry*. 59 Suppl 8:30-6. Review.
- Depke M, Fusch G, Domanska G, Geffers R, Völker U, Schuett C, Kiank C. 2008. Hypermetabolic syndrome as a consequence of repeated psychological stress in mice. *Endocrinology*. 149(6):2714-23.
- Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA. 2003. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci*. 23(6):2371-82
- Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 34(5):605-13.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258(5090):1946-9.
- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG. 2003. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci*. 23(12):4850-7.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. 1994. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 372(6507):686-91
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. 1999. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*. 1998. (12):521-8. Review. Erratum in: *Trends Neurosci* Feb;22(2):80.

- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Brandi I, Jefferson RG, Winckler RL, Davis JB, Dasse O, Mahadevan A, Razdan RK, Martin BR. 2001. Highly selective CB(1) cannabinoid receptor ligands and novel CB(1)/VR(1) vanilloid receptor "hybrid" ligands. *Biochem Biophys Res Commun.* 281(2):444-51.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Fezza F, Ligresti A, Bisogno T. Anandamide receptors. 2002. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 66(2-3):377-91. Review
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T. 2005. The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol.* (168):147-85. Review.
- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D. 2002. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 99(16):10819-24.
- Docagne F., Muneton V., Clemente D., Ali C., Loria F., Correa F., Hernangomez M., Mestre L., Vivien D. and Guaza C. 2007. Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation. *Mol. Cell. Neurosci.* pp. 551–561
- Docagne F, Mestre L, Loria F, Hernangómez M, Correa F, Guaza C. 2008. Therapeutic potential of CB2 targeting in multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets.* 12(2):185-95. Review.
- Du H, Chen X, Zhang J, Chen C. 2011. Inhibition of COX-2 expression by endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is mediated via PPAR- γ . *Br J Pharmacol.* 163(7):1533-49.
- Duncan M, Millns P, Smart D, Wright JE, Kendall DA, Ralevic V. 2004. "Noladin ether, a putative endocannabinoid, attenuates sensory neurotransmission in the rat isolated mesenteric arterial bed via a non-CB1/CB2 Gi/o linked receptor". *Br. J. Pharmacol.* 142 (3): 509–18
- Dunn, A. J. y Berridge, C. W. 1990. Is corticotropin-releasing factor a mediator of stress responses? *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 579: 183-191
- Dunn, A. J., Wang, J., y Ando, T. 1999. Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress. *Adv.Exp.Med.Biol.* 461: 117-127
- Echeverry MB, Guimarães FS, Del Bel EA. 2004. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. *Neuroscience.* 125(4):981-93
- Eckart C, Kaufmann J, Kanowski M, Tempelmann C, Hinrichs H, Elbert T, Heinze HJ, Kolassa IT. 2012. Magnetic resonance volumetry and spectroscopy of hippocampus and insula in relation to severe exposure of traumatic stress. *Psychophysiology.* 49(2):261-70.
- Egertová M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR. 1998. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci.* 265(1410):2081-5.
- Egertová M, Cravatt BF, Elphick MR. 2003. Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience.* 119(2):481-96.
- Ehrhart J, Obregon D, Mori T, Hou H, Sun N, Bai Y, Klein T, Fernandez F, Tan J, Shytle RD.J. 2005. Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *Neuroinflammation.* 2:29.
- Elenkov, I. J. y Chrousos, G. P. 2002. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 966: 290-303
- Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, Hoernagl H, Raine CS, Schneider-Stock R, Nitsch R, Ullrich O. 2006. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron.* 49(1):67-79.
- Esch T, Stefano GB, Fricchione GL, Benson H. 2002a. The role of stress in neurodegenerative diseases and mental disorders. *Neuro Endocrinol Lett.* 23(3):199-208. Review.

- Esch T, Stefano GB, Fricchione GL, Benson H. 2002. Stress-related diseases -a potential role for nitric oxide. *Med Sci Monit.* 6:RA103-18. Review.
- Esposito G, De Filippis D, Steardo L, Scuderi C, Savani C, Cuomo V, Iuvone T. 2006. CB1 receptor selective activation inhibits beta-amyloid-induced iNOS protein expression in C6 cells and subsequently blunts tau protein hyperphosphorylation in co-cultured neurons. *Neurosci Lett.* 404(3):342-6.
- Esposito G, De Filippis D, Maiuri MC, De Stefano D, Carnuccio R, Iuvone T. 2006. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement. *Neurosci Lett.* 399(1-2):91-5.
- Evanson NK, Tasker JG, Hill MN, Hillard CJ, Herman JP. 2010. Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. *Endocrinology* 151:4811–4819.
- Farkas I, Tuboly G, Benedek G, Horvath G. 2011. The antinociceptive potency of N-arachidonoyl-dopamine (NADA) and its interaction with endomorphin-1 at the spinal level. *Pharmacol Biochem Behav.* 99(4):731-7.
- Fegley D, Kathuria S, Mercier R, Li C, Goutopoulos A, Makriyannis A, Piomelli D. 2004. Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(23):8756-61.
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. 1995. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol.* 48(3):443-50.
- Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. 1996. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* 393:231-235.
- Feinstein, D. L. 2003. Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptor agonists for neurological disease. *Diabetes Technol Ther.* 5: 67-73
- Fernández-López D, Martínez-Orgado J, Nuñez E, Romero J, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I. 2006. Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatr Res.* 60(2):169-73.
- Fernández-Ruiz J, González S. 2005. Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia. *Handb Exp Pharmacol.* 168: 479-507
- Fernández-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolón RM, Ramos JA, Guzmán M. 2007. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci.* 1:39-45.
- Ferragud, A. Haro, A. Sylvain, C. Velazquez-Sanchez, V. Hernandez-Rabaza and J.J. 2010. Canales, Enhanced habit-based learning and decreased neurogenesis in the adult hippocampus in a murine model of chronic social stress. *Behav. Brain Res.* pp. 134–139
- Ferré P. 2004. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 53 Suppl 1:S43-50.
- Fimiani C, Liberty T, Aquirre AJ, Amin I, Ali N, Stefano GB. 1999. Opiate, cannabinoid, and eicosanoid signaling converges on common intracellular pathways nitric oxide coupling. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 57(1):23-34
- Forlenza MJ, Miller GE. 2006. Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. *Psychosom Med.* 68(1):1-7.
- Fowler CJ. 2003. Plant-derived, synthetic and endogenous cannabinoids as neuroprotective agents. Non-psychoactive cannabinoids, 'entourage' compounds and inhibitors of N-acyl ethanolamine

- breakdown as therapeutic strategies to avoid psychotropic effects. *Brain Res Brain Res Rev.* 41(1):26-43. Review.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. 2003. Role of Endogenous Cannabinoids in Synaptic Signaling. *Physiol Rev* 83: 1017-66.
- Fride E, Fox A, Rosenberg E, Faigenboim M, Cohen V, Barda L, Blau H, Mechoulam R. 2003. Milk intake and survival in newborn cannabinoid CB1 receptor knockout mice: evidence for a "CB3" receptor. *Eur J Pharmacol.* 461(1):27-34.
- Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodríguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D. 2003. Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature.* 4;425(6953):90-3.
- Fu J, Bottegoni G, Sasso O, Bertorelli R, Rocchia W, Masetti M, Guijarro A, Lodola A, Armirotti A, Garau G, Bandiera T, Reggiani A, Mor M, Cavalli A, Piomelli D. 2011. A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons *Nat Neurosci.*
- Fuller RW. 1981. Serotonergic stimulation of pituitary-adrenocortical function in rats. *Neuroendocrinology.* 32(2):118-27.
- Funder JW. 1993. Mineralocorticoids, glucocorticoids, receptors and response elements. *Science.* 259(5098):1132-3.
- Furay AR, Bruestle AE, Herman JP. 2008. The role of the forebrain glucocorticoid receptor in acute and chronic stress. *Endocrinology* 149:5482-5490.
- Gaetani S, Kaye WH, Cuomo V, Piomelli D. 2008. "Role of endocannabinoids and their analogues in obesity and eating disorders". *Eat Weight Disord* 13 (3): e42-8
- Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem.* 232(1):54-61.
- Ganon-Elazar E, Akirav I. 2012. Cannabinoids prevent the development of behavioral and endocrine alterations in a rat model of intense stress. *Neuropsychopharmacology.* 37(2):456-66.
- Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, Guzmán M. 2007. The endocannabinoid system and neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist.* 13(2):109-14. Review.
- Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, Guzmán M. 2008. Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system. *Curr Pharm Des.* 14(23):2279-88. Review.
- Ganon-Elazar E, Akirav I. 2009. Cannabinoid receptor activation in the basolateral amygdala blocks the effects of stress on the conditioning and extinction of inhibitory avoidance. *J Neurosci.* 29(36):11078-88.
- Ganon-Elazar E, Akirav. 2012. Cannabinoids prevent the development of behavioral and endocrine alterations in a rat model of intense stress. *Neuropsychopharmacology.* 37(2):456-66.
- Gaoni Y, Mechoulam R. 1964. Isolation, Structure and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc.* 1964, 86: 1646-7.
- Gaoni Y, Mechoulam R. 1971. The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc.* 13;93(1):217-24.
- García-Bueno, B., Madrigal, J. L., Lizasoain, I., Moro, M. A., Lorenzo, P., y Leza, J. C. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation decreases neuroinflammation in brain after stress in rats. *Biol.Psychiatry* 57: 885-894.
- García-Bueno B, Caso JR, Pérez-Nievas BG, Lorenzo P, Leza JC (2007). Effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists on brain glucose and glutamate transporters after stress in rats. *Neuropsychopharmacology.* 2007 Jun;32(6):1251-60.

- García-Bueno B, Caso JR, Leza JC. 2008. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 32(6):1136-51. Review.
- García-Gutiérrez MS, Pérez-Ortiz JM, Gutiérrez-Adán A, Manzanares J. 2010. Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB(2) receptors. *Br J Pharmacol.* 160(7): 1773-1784.
- García-Gutiérrez MS and Manzanares J. 2011. Overexpression of CB2 cannabinoid receptor gene expression decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. *J Psychopharmacol* 25 (1): 111-120.
- García-Ovejero D, Arevalo-Martin A, Petrosino S, Docagne F, Hagen C, Bisogno T, Watanabe M, Guaza C, Di Marzo V, Molina-Holgado E. 2009. The endocannabinoid system is modulated in response to spinal cord injury in rats. *Neurobiol Dis.* 33(1):57-71.
- Gardner A, Boles RG. 2011. Beyond the serotonin hypothesis: mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 35(3):730-43. Review.
- Garvey WT, Huecksteadt TP, Lima FB, Birnbaum MJ. 1989. Expression of a glucose transporter gene cloned from brain in cellular models of insulin resistance: dexamethasone decreases transporter mRNA in primary cultured adipocytes. *Mol Endocrinol.* Jul;3(7):1132-41.
- Gateley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A. 1996. 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol.* Jul 4;307(3):331-8.
- Gateley SJ, Lan R, Volkow ND, Pappas N, King P, Wong CT, Gifford AN, Pyatt B, Dewey SL, Makriyannis A. 1998. Imaging the brain marijuana receptor: development of a radioligand that binds to cannabinoid CB1 receptors in vivo. *J Neurochem.* Jan;70(1):417-23.
- Gérard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. 1991. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J.* Oct 1;279 (Pt 1):129-34.
- Gerlach JL, McEwen BS. 1972. Rat brain binds adrenal steroid hormone: radioautography of hippocampus with corticosterone. *Science.* Mar 10;175(26):1133-6.
- Gibbons J.L. y McHugh P.R. 1962. Plasma cortisol in depressive illness. *J.Psychiatr.Res.* 1: 162-171
- Gilad GM, Gilad VH, Casanova MF, Casero RA Jr. 1995. Polyamines and their metabolizing enzymes in human frontal cortex and hippocampus: preliminary measurements in affective disorders. *Biol Psychiatry.* Aug 15;38(4):227-34.
- Gilbert GL, Kim HJ, Waataja JJ, Thayer SA. 2007. Delta9-tetrahydrocannabinol protects hippocampal neurons from excitotoxicity. *Brain Res.* Jan 12;1128(1):61-9.
- Givalois L, Naert G, Rage F, Ixart G, Arancibia S, Tapia-Arancibia L. 2004. A single brain-derived neurotrophic factor injection modifies hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis activity in adult male rats. *Mol Cell Neurosci.* Nov;27(3):280-95.
- Glass M, Dragunow M, Faul RL. 1997. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience.* Mar;77(2):299-31.
- Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R, Bortolato M, Campolongo P, Solinas M, Cassano T, Morgese MG, Debonnel G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Mor M, Trezza V, Goldberg SR, Cuomo V, Piomelli D. 2005. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 20;102(51):18620-5.
- Godlewski, G.; Offertáler, L.; Wagner, J. A.; Kunos, G. 2009. "Receptors for acylethanolamides—GPR55 and GPR119". *Prostaglandins & Other Lipid Mediators.* 89 (3-4): 105–297.

- Gold, P. W., Calabrese, J. R., Kling, M. A., Avgerinos, P., Khan, I., Gallucci, W. T., Tomai, T. P., y Chrousos, G. P. 1986. Abnormal ACTH and cortisol responses to ovine corticotropin releasing factor in patients with primary affective disorder. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry*. 10: 57-65.
- Gomes F. V., Resstel L. B., Guimaraes F. S. 2011. The anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis are mediated by 5-HT1A receptors. *Psychopharmacology (Berl.)* 213, 465–473.
- Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M. 2000. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J.* Apr 15;347(Pt 2):369-73.
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. 2006. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* Feb 3;1071(1):10-23.
- Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW. 2000. Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol*, 57(5):1045-50.
- Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem.* 1996 May;66(5):1836-44.
- Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, Yamamoto S. 1998. Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett*, 422(1):69-73.
- Gorman M. and Docherty J.P., 2010. A hypothesized role for dendritic remodeling in the etiology of mood and anxiety disorders. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 22,pp. 256–264.
- Gould, E., Cameron, H.A., Daniels, D.C., Woolley, C.S. & McEwen, B.S. 1992. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J. Neurosci.*, 12, 3642–3650.
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. 1997. *J Neurosci.* Apr 1;17(7):2492-8.
- Grahn RE, Watkins LR, Maier SF. Impaired escape performance and enhanced conditioned fear in rats following exposure to an uncontrollable stressor are mediated by glutamate and nitric oxide in the dorsal raphe nucleus. *Behav Brain Res.* 2000 Jul;112(1-2):33-41.
- Graybeal C, Kiselycznyk C, Holmes A. 2012. Stress-Induced Deficits in Cognition and Emotionality: A Role for Glutamate. *Curr Top Behav Neurosci.* Jan 20.
- Griffin G, Wray EJ, Tao Q, McAllister SD, Rorrer WK, Aung MM, Martin BR, Abood ME. 1999. Evaluation of the cannabinoid CB2 receptor-selective antagonist, SR144528: further evidence for cannabinoid CB2 receptor absence in the rat central nervous system. *Eur J Pharmacol.* Jul 14;377(1):117-25.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M. 2012. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol.* Mar 24;350(2):299-309.
- Grotenhermen F. 2004. Pharmacology of cannabinoids. *Neuro Endocrinol Lett.* Feb-Apr;25(1-2):14-23. Review
- Grundy RI, Rabuffetti M, Beltramo M. 2001. Cannabinoids and neuroprotection. *Mol Neurobiol.* Aug-Dec;24(1-3):29-51.
- Grundy RI The therapeutic potential of the cannabinoids in neuroprotection. 2002. *Expert Opin Investig Drugs.* Oct;11(10):1365-74. Review.

- Gulyas AI, Cravatt BF, Bracey MH, Dinh TP, Piomelli D, Boscia F, Freund TF. 2004. Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur J Neurosci*, 20(2):441-58.
- Guzmán M, Sánchez C. 1999. Effects of cannabinoids on energy metabolism. *Life Sci*. ;65(6-7):657-64. Review.
- Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperth I. 2001. Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. *J Mol Med*, 78: 613-25
- Guzmán M, Lo Verme J, Fu J, Oveisi F, Blázquez C, Piomelli D. 2004. Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J Biol Chem*, 279(27):27849-54.
- Halliwel B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. Jun;97(6):1634-58. Review
- Hampson RE, Evans GJ, Mu J, Zhuang SY, King VC, Childers SR, Deadwyler SA. 1995. Role of cyclic AMP dependent protein kinase in cannabinoid receptor modulation of potassium "A-current" in cultured rat hippocampal neurons. *Life Sci*;56(23-24):2081-8.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Lolic M, Wink D, Rosenthal R, Axelrod J, Ann N Y. 2000. Neuroprotective antioxidants from marijuana. *Acad Sci*. 899:274-82.
- Hampson RE, Deadwyler SA. Role of cannabinoid receptors in memory storage. 1998. *Neurobiol Dis*. Dec;5(6 Pt B):474-82. Review.
- Hansen HH, Schmid PC, Bittigau P, Lastres-Becker I, Berrendero F, Manzanares J, Ikonomidou C, Schmid HH, Fernández-Ruiz JJ, Hansen HS. 2001. Anandamide, but not 2-arachidonoylglycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration. *J Neurochem*. Sep;78(6):1415-27.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. (2001) 2-arachidonoyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(7):3662-5.
- Hanus LO. Discovery and isolation of anandamide and other endocannabinoids. 2007. *Chem Biodivers*. Aug;4(8):1828-41. Review.
- Häring M, Guggenhuber S, Lutz B. 2012. Neuronal populations mediating the effects of endocannabinoids on stress and emotionality. *Neuroscience*. Jan 2.
- Harvey BS, Ohlsson KS, Määg JL, Musgrave IF, Smid SD. 2012. Contrasting protective effects of cannabinoids against oxidative stress and amyloid- β evoked neurotoxicity in vitro. *Neurotoxicology*. Jan;33(1):138-46.
- Hayase T, Yamamoto Y, Yamamoto K. 2000. Stress-related behavioral alterations accompanying cocaine toxicity: the effects of mixed opioid drugs. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*. Dec;35(6):402-14.
- Heine VM, Maslam S, Joëls M, Lucassen PJ. 2004. Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. *Neurobiol Aging*. Mar;25(3):361-75.
- Herkenham M, Lynn AB, de Costa BR, Richfield EK. 1991a. Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res*. May 3;547(2):267-74.
- Hill MN, Ho WS, Meier SE, Gorzalka BB, Hillard CJ. Chronic corticosterone treatment increases the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the rat amygdala. *Eur J Pharmacol*. 2005 Dec 28;528(1-3):99-102.
- Hill MN, Gorzalka BB. 2009a. The endocannabinoid system and the treatment of mood and anxiety disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. Dec;8(6):451-8. Review.

- Hill MN, McLaughlin RJ, Morrish AC, Viau V, Floresco SB, Hillard CJ, Gorzalka BB. 2009b. Suppression of amygdalar endocannabinoid signaling by stress contributes to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuropsychopharmacology*. Dec; 34(13):2733-45.
- Hill M.N., McLaughlin R.J., Bingham B., Shrestha L., Lee T.T., Gray J.M., Hillard C.J., Gorzalka B.B. and Viau V., 2010b. Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, pp. 9406-9411.
- Hill MN, McLaughlin RJ, Pan B, Fitzgerald ML, Roberts CJ, Lee TT, Karatsoreos IN, Mackie K, Viau V, Pickel VM, McEwen BS, Liu QS, Gorzalka BB, Hillard CJ. 2011b. Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *J Neurosci* 31:10506-10515.
- Hill MN, Tasker JG. 2012. Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience*. Mar 1;204:5-16.
- Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahian A, Campbell WB. 1997. Accumulation of Narachidonoyl ethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem*, 69(2):631-8.
- Hillard CJ, Manna S, Greenberg MJ, DiCamelli R, Ross RA, Stevenson LA, Murphy V, Pertwee RG, Campbell WB. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). 1999. *J Pharmacol Exp Ther*. Jun;289(3):1427-33.
- Hillard CJ, Jarrahian A. 2003. Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy. *Br J Pharmacol*, 140(5):802-8.
- Hillard CJ, Shi L, Tuniki VR, Falck JR, Campbell WB. 2007. Studies of anandamide accumulation inhibitors in cerebellar granule neurons: comparison to inhibition of fatty acid amide hydrolase. *J Mol Neurosci*, 33(1):18-24.
- Hillard CJ, Weinlander KM, Stuhr KL. 2012. Contributions of endocannabinoid signaling to psychiatric disorders in humans: genetic and biochemical evidence. *Neuroscience*. Mar 1;204:207-29.
- Holaday JW. 1983. Cardiovascular consequences of endogenous opiate antagonism. *Biochem Pharmacol*. Feb 15;32(4):573-85
- Holsboer F, Grasser A, Friess E, Wiedemann K. 1994. Steroid effects on central neurons and implications for psychiatric and neurological disorders. *Ann N Y Acad Sci*. Nov 30;746:345-59. Review.
- Holmes and Wellman, 2009. A. Holmes and C.L. Wellman, Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 33 pp. 773-783
- Holsboer F, Grasser A, Friess E, Wiedemann K. 1994. Steroid effects on central neurons and implications for psychiatric and neurological disorders. *Ann N Y Acad Sci*. Nov 30;746:345-59.
- Holsboer F, Ising M. 2010. Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annu Rev Psychol*. 61:81-109, C1-11. Review.
- Horner HC, Munck A, Lienhard GE. 1987. Dexamethasone causes translocation of glucose transporters from the plasma membrane to an intracellular site in human fibroblasts. *J Biol Chem*. Dec 25;262(36):17696-702.
- Horner HC, Packan DR, Sapolsky RM. 1990. Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology*. Jul;52(1):57-64.
- Howlett TA, Rees LH. 1986. Endogenous opioid peptides and hypothalamo-pituitary function. *Annu Rev Physiol*. ;48:527-36.
- Howlett AC. 1998. The CB1 cannabinoid receptor in the brain. *Neurobiol Dis*, 5: 405-16

- Howlett AC, Mukhopadhyay S. 2000. Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids*. Nov;108(1-2):53-70. Review.
- Howlett AC. 2002. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. Aug;68-69:619-31. Review.
- Howlett A.C. 2004. Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction. *Br J Pharmacol*, 142: 1209-18
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V. 2002. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 11;99(12):8400-5.
- Huestis MA, Gorelick DA, Heishman SJ, Preston KL, Nelson RA, Moolchan ET, Frank RA. 2001. Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Arch Gen Psychiatry*. Apr;58(4):322-8.
- Hüll M, Strauss S, Berger M, Volk B, Bauer J. 1996. The participation of interleukin-6, a stress-inducible cytokine, in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. Jun;78(1):37-41.
- Ibrahim MM, Deng H, Zvonok A, Cockayne DA, Kwan J, Mata HP, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Makriyannis A, Malan TP Jr. 2003. Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain: pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 2;100(18):10529-33.
- Ishiguro H, Horiuchi Y, Ishikawa M, Koga M, Imai K, Suzuki Y, Morikawa M, Inada T, Watanabe Y, Takahashi M, Someya T, Ujike H, Iwata N, Ozaki N, Onaivi ES, Kunugi H, Sasaki T, Itokawa M, Arai M, Niizato K, Iritani S, Naka I, Ohashi J, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T. Brain cannabinoid CB2 receptor in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2010 May 15;67(10):974-82.
- Issa G, Wilson C, Terry AV Jr, Pillai A. 2010. An inverse relationship between cortisol and BDNF levels in schizophrenia: data from human postmortem and animal studies. *Neurobiol Dis*. Sep;39(3):327-33.
- Iyer AM, Brooke SM, Sapolsky RM. Glucocorticoids interact with gp120 in causing neurotoxicity in striatal cultures. *Brain Res*. 1998 Oct 19;808(2):305-9.
- Izzo A. A., Borrelli F., Capasso R., Di Marzo V., Mechoulam R. 2009. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci*. 30, 515–527.
- Jacobson L, Sapolsky R. 1991. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12:118–134.
- Jaferi A, Nowak N, Bhatnagar S. 2003. Negative feedback functions in chronically stressed rats: role of the posterior paraventricular thalamus *Physiol Behav*. 78:365–373.
- Jaferi A, Bhatnagar S (2006) Corticosterone can act at the posterior paraventricular thalamus to inhibit hypothalamic-pituitary-adrenal activity in animals that habituate to repeated stress. *Endocrinology* 147:4917–4930.
- Jankord R, Herman JP. 2008. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann NY Acad Sci*. Dec;1148:64-73. Review.
- Járai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A, Kunos G. 1999. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 23;96(24):14136-41.

- Jarvis SE, Zamponi GW. 2001. Interactions between presynaptic Ca^{2+} channels, cytoplasmic messengers and proteins of the synaptic vesicle release complex. *Trends Pharmacol . Sci.* Oct;22(10):519-25. Review.
- Jean-Gilles L, Gran B, Constantinescu CS. 2010. Interaction between cytokines, cannabinoids and the nervous system. *Immunobiology.* Aug; 215(8):606-10. Review.
- Jeon YJ, Yang KH, Pulaski JT, Kaminski NE. 1996. Attenuation of inducible nitric oxide synthase gene expression by delta 9-tetrahydrocannabinol is mediated through the inhibition of nuclear factor-kappa B/Rel activation. *Mol Pharmacol* Aug; 50(2):334-41.
- Jezová D, Tokarev D, Rusnák M. 1995. Endogenous excitatory amino acids are involved in stress-induced adrenocorticotropin and catecholamine release. *Neuroendocrinology.* Oct;62(4):326-32.
- Jin K, Xie L, Kim SH, Parmentier-Batteur S, Sun Y, Mao XO, Childs J, Greenberg DA. 2004. Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol Pharmacol.* Aug;66(2):204-8.
- Jones MT, Hillhouse EW, Burden JL. 1977. Structure-activity relationships of corticosteroid feedback at the hypothalamic level. *J Endocrinol* 74:415-424.
- Joosten M, Valk PJ, Jordà MA, Vankan-Berkhoudt Y, Verbakel S, van den Broek M, Beijen A, Löwenberg B, Delwel R. Leukemic predisposition of pSca-1/Cb2 transgenic mice. 2002. *Exp Hematol.* Feb;30(2):142-9.
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. 2004 Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature,* 427(6971):260-5.
- Joseph MH, Kennett GA. Stress-induced release of 5-HT in the hippocampus and its dependence on increased tryptophan availability: an in vivo electrochemical study. *Brain Res.* 1983 Jul 4;270(2):251-7.
- Jüttler E, Potrovita I, Tarabin V, Prinz S, Dong-Si T, Fink G, Schwaninger M. 2004. The cannabinoid dexamabinol is an inhibitor of the nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *Neuropharmacology.* Sep;47(4):580-92.
- Kaczocha M, Hermann A, Glaser ST, Bojesen IN, Deutsch DG. 2006. Anandamide uptake is consistent with rate-limited diffusion and is regulated by the degree of its hydrolysis by fatty acid amide hydrolase. *J Biol Chem.* Apr 7;281(14):9066-75.
- Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG. 2009. Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 106(15):6375-80.
- Kalin, N. H., Weiler, S. J., y Shelton, S. E. 1982. Plasma ACTH and cortisol concentrations before and after dexamethasone. *Psychiatry Res.* 7: 87-92
- Kaminski NE. 1998. Inhibition of the cAMP signaling cascade via cannabinoid receptors: a putative mechanism of immune modulation by cannabinoid compounds. *Toxicol Lett.* Dec 28;102-103:59-63. Review.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M. 2009. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev.* Jan;89(1):309-80. Review.
- Karishma, K.K. & Herbert, J. 2002. Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression. *Eur. J. Neurosci.,* 16, 445–453.
- Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornquist H, Holm C. 1997. cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Bio Chem,* 272(43):27218-23.

- Karmaus PW, Chen W, Crawford RB, Harkema JR, Kaplan BL, Kaminski NE. 2011. Deletion of cannabinoid receptors 1 and 2 exacerbates APC function to increase inflammation and cellular immunity during influenza infection. *J Leukoc Biol*. Aug 26
- Karten YJ, Olariu A, Cameron HA. 2005. Stress in early life inhibits neurogenesis in adulthood. *Trends Neurosci*. Apr;28(4):171-2.
- Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D. 2003. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*. Jan;9(1):76-81.
- Katona, I., Freund, T.F., 2008. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat. Med.* 14, 923–930.
- Keimpema E, Barabas K, Morozov YM, Tortoriello G, Torii M, Cameron G, Yanagawa Y, Watanabe M, Mackie K, Harkany T. 2010. Differential subcellular recruitment of monoacylglycerol lipase generates spatial specificity of 2-arachidonoyl glycerol signaling during axonal pathfinding. *J Neurosci*. Oct 20;30(42):13992-4007.
- Kerr DM, Burke NN, Ford GK, Connor TJ, Harhen B, Egan LJ, Finn DP, Roche M. 2011. Pharmacological inhibition of endocannabinoid degradation modulates the expression of inflammatory mediators in the hypothalamus following an immunological stressor. *Neuroscience*. Sep 19.
- Khanolkar AD, Abadji V, Lin S, Hill WA, Taha G, Abouzid K, Meng Z, Fan P, Makriyannis A. Head group analogs of arachidonylethanolamide, the endogenous cannabinoid ligand. *J Med Chem*. 1996 Oct 25;39(22):4515-9.
- Kharwanlang B, Sharma R. Molecular interaction between the glucocorticoid receptor and MAPK signaling pathway: a novel link in modulating the anti-inflammatory role of glucocorticoids. 2011. *Indian J Biochem Biophys*. Aug;48(4):236-42.
- Khaspekov L.G., Brenz Verca M.S., Frumkina L.E., Hermann H., Marsicano G. and Lutz B., 2004. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity. *Eur. J. Neurosci*, pp. 1691–1698
- Kiank C, Holtfrete B, Starke A, Mundt A, Wilke C, Schütt C. 2006. Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice. *Brain Behav Immun*. Jul;20(4).
- Kimball ES, Schneider CR, Wallace NH, Hornby PJ. 2006. Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulfate sodium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. Aug;291(2):G364-71.
- Kim SH, Won SJ, Mao XO, Jin K, Greenberg DA. 2006. Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity. *Mol Pharmacol*. 2006 Mar;69(3):691-6.
- Klegeris A, Bissonnette CJ, McGeer PL. 2003. Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. *Br J Pharmacol*. Jun;139(4):775-86.
- Klein TW, Lane B, Newton CA, Friedman H. 2000. The cannabinoid system and cytokine network. *Proc Soc Exp Biol Med* 225:1
- KleinTW, Cabral GA. Cannabinoid-induced immune suppression and modulation of antigen-presenting cells. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006, 1:50-64
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*. Jun;19(3):269-301. Review.
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. 1999. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci*. Oct;22(10):422-6. Review.

- de Kloet ER. 2000. Stress in the brain. *Eur J Pharmacol.* Sep 29;405(1-3):187-98. Review.
- de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* Jun;6(6):463-75. Review.
- Komeili A, O'Shea EK. Nuclear transport and transcription. *Curr Opin Cell Biol.* 2000, 12: 355-60
- König M, Zimmer AM, Steiner H, Holmes PV, Crawley JN, Brownstein MJ, Zimmer A. Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. *Nature.* 1996 Oct 10;383(6600):535-8.
- Kovács, K.J., Miklós, I.H. & Bali, B. 2004. GABAergic mechanisms constraining the activity of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1018, 466-476.
- Kozak KR, Rowlinson SW, Marnett LJ. 2000. Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 275(43):33744-9.
- Kozak KR, Gupta RA, Moody JS, Ji C, Boeglin WE, DuBois RN, Brash AR, Marnett LJ. 2002. 15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *J Biol Chem*, 277(26):23278-86.
- Kozak KR, Marnett LJ. 2002. Oxidative metabolism of endocannabinoids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 66(2-3):211-20.
- Kozak KR, Prusakiewicz JJ, Rowlinson SW, Prudhomme DR, Marnett LJ. 2003. Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid anandamide. *Biochemistry*, 42(30):9041-9
- Kozela E, Pietr M, Juknat A, Rimmerman N, Levy R, Vogel Z. 2010. Cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. *J Biol Chem.* Jan 15;285(3):1616-26.
- Kozłowska H, Baranowska M, Schlicker E, Kozłowski M, Laudański J, Malinowska B. 2008. Virodhamine relaxes the human pulmonary artery through the endothelial cannabinoid receptor and indirectly through a COX product. *Br J Pharmacol.* Dec;155(7):1034-42.
- Kumari B, Kumar A, Dhir A. 2007. Protective effect of non-selective and selective COX-2-inhibitors in acute immobilization stress-induced behavioral and biochemical alterations. *Pharmacol Rep.* Nov-Dec;59(6):699-707.
- Kuroda Y, Mori T, Hori T. 1994. Restraint stress suppresses experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Brain Res Bull.* 34(1):15-7.
- Lambert, D.M., Vandevoorde, S., Diependaele, G., Govaerts, S.J., Robert, A.R. 2001. "Anticonvulsant activity of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid, in mice." *Epilepsia* 42 (3): 321-7.
- Lambert DM, Fowler CJ. 2005. The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J Med Chem*, 48(16):5059-87.
- Langeland W, Olff M. 2008. Psychobiology of posttraumatic stress disorder in pediatric injury patients: a review of the literature. *Neurosci Biobehav Rev* (1):161-74.
- Lauckner, J.B. Jensen, H.Y. Chen, H.C. Lu, B. Hille and K. Mackie. 2008. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, pp. 2699–2704.
- Lawrence MS, Sapolsky RM. 1994. Glucocorticoids accelerate ATP loss following metabolic insults in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.* 646(2):303-6.
- Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM. 2002. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disord.* Apr;4(2):117-28. Review

- Lee et al., Y.J. Lee, B. Choi, E.H. Lee, K.S. Choi and S. Sohn. 2006. Immobilization stress induces cell death through production of reactive oxygen species in the mouse cerebral cortex, *Neurosci. Lett.* 392 (2006), pp. 27–31.
- Lee S, Kim DH, Yoon SH, Ryu JH. 2009. Sub-chronic administration of rimonabant causes loss of antidepressive activity and decreases doublecortin immunoreactivity in the mouse hippocampus. *Neurosci Lett.* 467:111–116.
- Lemos J. I., Resstel L. B., Guimaraes F. S. 2010. Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. *Behav. Brain Res.* 207, 105–111.
- Lépicier P, Bibeau-Poirier A, Lagneux C, Servant MJ, Lamontagne D. 2006. Signaling pathways involved in the cardioprotective effects of cannabinoids. *J Pharmacol Sci.* Oct;102(2):155-66. Review.
- Levine S. y Ursin H. 1991. What is stress? 3-21 M.R. Brown, G.F. Koob, C. Rivier (Eds.), *Stress: Neurobiology and Neuroendocrinology*, Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 3–21.
- Levine, J., Barak, Y., Chengappa, K. N., Rapoport, A., Rebey, M., y Barak, V. 1999. Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression. *Neuropsychobiology* 40: 171-176
- Lewy AJ, Bauer VK, Cutler NL, Sack RL. 1998. Melatonin treatment of winter depression: a pilot study. *Psychiatry Res.* Jan 16;77(1):57-61.
- Leza, J. C., Salas, E., Sawicki, G., Russell, J. C., y Radomski, M. W. 1998. The effects of stress on homeostasis in JCR-LA-cp rats: the role of nitric oxide. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 286: 1397-1403
- Lichtman AH, Shelton CC, Advani T, Cravatt BF. 2004a. Mice lacking fatty acid amide hydrolase exhibit a cannabinoid receptor-mediated phenotypic hypoalgesia. *Pain.* Jun;109(3):319-27.
- Lichtman AH, Leung D, Shelton CC, Saghatelian A, Hardouin C, Boger DL, Cravatt BF. 2004b. Reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase that promote analgesia: evidence for an unprecedented combination of potency and selectivity. *J Pharmacol Exp Ther.* Nov;311(2):441-8.
- Lightman, S. L. y Young, W. S., III. 1988. Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. *J.Physiol* 403: 511-523
- Linthorst AC, Flachskamm C, Hopkins SJ, Hoadley ME, Labeur MS, Holsboer F, Reul JM. 1997. Long-term intracerebroventricular infusion of corticotropin-releasing hormone alters neuroendocrine, neurochemical, autonomic, behavioral, and cytokine responses to a systemic inflammatory challenge. *J Neurosci.* Jun 1;17(11):4448-60.
- Lipton SA. 1999. Neuronal protection and destruction by NO. *Cell Death Differ.* Oct;6(10):943-51. Review.
- Liu J, Li H, Burstein SH, Zurier RB, Chen JD. (2003a) Activation and binding of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by synthetic cannabinoid ajulemic acid. *Mol Pharmacol*, 63(5):983-92.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim HY, Kunos G. 2006. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 5;103(36):13345-50.
- Liu, Q.R.; Pan, C.H.; Hishimoto, A.; Li, C.Y.; Xi, Z.X.; Llorente-Berzal, A.; Viveros, M.P.; Ishiguro, H.; Arinami, T.; Onaivi, E.S. 2009. Species differences in cannabinoid receptor 2 (CNR2 gene): identification of novel human and rodent CB2 isoforms, differential tissue expression and regulation by cannabinoid receptor ligands. *Genes Brain Behav.*, 8, 519-530
- López JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ. A.E. 1998. Regulation of serotonin1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiatry.* Apr 15;43(8):547-73.

- Loria F., Petrosino S., Hernangomez M., Mestre L., Spagnolo A., Correa F., Di M., Di Marzo V., Docagne F. and Guaza C., 2010. An endocannabinoid tone limits excitotoxicity in vitro and in a model of multiple sclerosis. *Neurobiol. Dis.*, 37, pp. 166–176.
- Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. 2005. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol.* Jan;67(1):15-9.
- LoVerme J, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. 2005. Review The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci*, 77(14):1685-98.
- Lowy MT, Gault L, Yamamoto BK. Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. *J Neurochem.* 1993 Nov;61(5):1957-60.
- Lowy MT, Wittenberg L, Novotney S. 1994. Adrenalectomy attenuates kainic acid-induced spectrin proteolysis and heat shock protein 70 induction in hippocampus and cortex. *J Neurochem.* Sep;63(3):886-94.
- Lucas, S. M., Rothwell, N. J., y Gibson, R. M. 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br.J.Pharmacol.* 147 Suppl 1: S232-S240.
- Lutz B. Endocannabinoid signals in the control of emotion. 2009. *Curr Opin Pharmacol.* Feb;9(1):46-52.20. Review.
- Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di Marzo V, Finazzi-Agrò A. 2000. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem*, 275(18):13484-92.
- Maccarrone, M. Gasperi, V. Catani, M. V. Diep, T. A. Dainese, E. Hansen, H. S. and Avigliano, L. (2010).The endocannabinoid system and its relevance for nutrition. *Annu.Rev. Nutr.* 30, 423–440.
- Mackie K. 2005. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol.* (168):299-325. Review.
- Madrigal JL, Hurtado O, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Boscá L, Leza JC. 2002. The increase in TNF- α levels is implicated in NF- κ B activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. *Neuropsychopharmacology.* Feb;26(2):155-63.
- Madrigal, J. L., Moro, M. A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Fernandez, A. P., Rodrigo, J., Bosca, L., y Leza, J. C. 2003. Induction of cyclooxygenase-2 accounts for restraint stress-induced oxidative status in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 28: 1579-1588.
- Madrigal JL, García-Bueno B, Caso JR, Pérez-Nievas BG, Leza JC. Stress-induced oxidative changes in brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2006 Oct;5(5):561-8. Review.
- Madroñal N, Gruart A, Valverde O, Espadas I, Moratalla R, Delgado-García JM. 2011. Involvement of Cannabinoid CB1 Receptor in Associative Learning and in Hippocampal CA3-CA1 Synaptic Plasticity. *Cereb Cortex.* Jun 14.
- Maes M, Van Gastel A, Delmeire L, Kenis G, Bosmans E, Song C. 2002. Platelet α 2-adrenoceptor density in humans: relationships to stress-induced anxiety, psychasthenic constitution, gender and stress-induced changes in the inflammatory response system. *Psychol Med.* Jul;32(5):919-28.
- Maes M, Mihaylova I, Ruyter MD, Kubera M, Bosmans E. 2007. The immune effects of TRYCAT's (tryptophan catabolites along the IDO pathway): relevance for depression - and other conditions characterized by tryptophan depletion induced by inflammation. *Neuro Endocrinol Lett.* Dec;28(6):826-31.

- Maes M. 2009. "Functional" or "psychosomatic" symptoms, e.g. a flu-like malaise, aches and pain and fatigue, are major features of major and in particular of melancholic depression. *Neuro Endocrinol Lett.*;30(5):564-73.
- Maes M. An intriguing and hitherto unexplained co-occurrence: Depression and chronic fatigue syndrome are manifestations of shared inflammatory, oxidative and nitrosative (IO&NS) pathways. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011 Apr 29;35(3):784-94. Review.
- Maes M, Kubera M, Obuchowiczwa E, Goehler L, Brzeszcz J. 2011. Depression's multiple comorbidities explained by (neuro)inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. *Neuro Endocrinol Lett.*; 32(1):7-24.
- Maier SF. Stressor controllability and stress-induced analgesia. 1986. *Ann N Y Acad Sci.* 467:55-72. Review.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. 1992. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 1992, 48:655-68.
- Mailleux P, Verslype M, Preud'homme X, Vanderhaeghen JJ. 1994. Activation of multiple transcription factor genes by tetrahydrocannabinol in rat forebrain. *Neuroreport.* Jun 2;5(10):1265-8.
- Malcher-Lopes R, Di S, Marcheselli VS, Weng FJ, Stuart CT, Bazan NG, Tasker JG. 2006. Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. *J Neurosci.* 26:6643-6650
- Mancuso M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G, Murri. 2006. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.* Sep;10(1):59-73. Review
- Marchalant Y, Brothers HM, Norman GJ, Karelina K, DeVries AC, Wenk GL. 2009a. Cannabinoids attenuate the effects of aging upon neuroinflammation and neurogenesis. *Neurobiol Dis.* May;34(2):300-7.
- Marco Eva M., García-Gutiérrez María S., Bermúdez-Silva Francisco-Javier, Moreira Fabricio A., Guimarães Francisco, Manzanares Jorge, and Viveros María-Paz., 2011. Endocannabinoid System and Psychiatry: In Search of a Neurobiological Basis for Detrimental and Potential Therapeutic Effects *Front Behav Neurosci.*; 5: 63.
- Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN. 2005. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem.* Oct;95(2):437-45.
- Maresz K, Pryce G, Ponomarev ED, Marsicano G, Croxford JL, Shriver LP, Ledent C, Cheng X, Carrier EJ, Mann MK, Giovannoni G, Pertwee RG, Yamamura T, Buckley NE, Hillard CJ, Lutz B, Baker D, Dittel BN. 2007. Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nat Med.* 2007 Apr;13(4):492-7.
- Marrs WR. 2010. The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat Neurosci.* 13:951-957.
- Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C. 2002. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem.* 2002 Feb; 80(3):448-56.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutiérrez SO, van der Stelt M, López-Rodríguez ML, Casanova E, Schütz G, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B. 2003. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science.* 2003 Oct 3; 302(5642):84-8.
- Marsicano G, Chaouloff F. 2011. Moving bliss: a new anandamide transporter. *Nat Neurosci.* Dec 23;15(1):5-6.

- Martín-Moreno AM, Reigada D, Ramírez BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, de Ceballos ML. 2011. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol.* Jun;79(6):964-73.
- Mascia P., Pistis M., Justinova Z., Panlilio L. V., Luchicchi A., Lecca S., Scherma M., Fratta W., Fadda P., Barnes C., Redhi G. H., Yasar S., Le Foll B., Tanda G., Piomelli D., Goldberg S. R. 2011. Blockade of nicotine reward and reinstatement by activation of alpha-type peroxisome proliferator-activated receptors. *Biol. Psychiatry* 69, 633–641.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI . 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* Aug 9;346(6284):561-4.
- Mazzola C., Medalie J., Scherma M., Panlilio L. V., Solinas M., Tanda G., Drago F., Cadet J. L., Goldberg S. R., Yasar S. 2009. Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. *Learn. Mem.* 16, 332–337.
- McCarty R, Gold PE. Catecholamines, stress, and disease: a psychobiological perspective. 1996. *Psychosom Med.* Nov-Dec;58(6):590-7. Review.
- McCubbin JA. 1993. Stress and endogenous opioids: behavioral and circulatory interactions. *Biol Psychol.* Apr;35(2):91-122. Review.
- McEwen BS, Weiss JM, Schwartz LS. 1968. Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. *Nature.* Nov 30; 220(5170):911-2.
- McEwen, B.S., Stellar, E. 1993. "Stress and the individual: mechanism leading to disease", *Archives of Internal Medicine*, Vol. 153 pp.2093-101.
- McEwen BS. 1998. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci.* May 1;840:33-44. Review.
- McEwen BS. 1999. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 22:105-22. Review.
- McEwen BS. 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* Dec 15;886(1-2): 172-189. Review.
- McEwen BS, Magarinos AM. 2001. Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. *Hum Psychopharmacol.* Jan;16(S1):S7-S19.
- McEwen, 2005 B.S. 2005. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metabolism*, 54, pp. 20–23.
- McFarland MJ, Porter AC, Rakhshan FR, Rawat DS, Gibbs RA, Barker EL. 2004. A role for caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide. *J Biol Chem*, 279(40): 41991-7.
- McHugh D, Tanner C, Mechoulam R, Pertwee RG, Ross RA. 2008. Inhibition of human neutrophil chemotaxis by endogenous cannabinoids and phytocannabinoids: evidence for a site distinct from CB1 and CB2. *Mol Pharmacol.*; 73:441–450.
- McKittrick CR, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR. 1995. Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress *Biol Psychiatry.* Mar 15;37(6):383-93.
- McLeod TM, López-Figueroa AL, López-Figueroa MO. 2001. Nitric oxide, stress, and depression. *Psychopharmacol Bull.* Winter;35(1):24-41. Review.
- Mechoulam R., Shvo Y. 1963. The structure of cannabidiol. *Tetrahedron.*
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* Jun 29;50(1):83-90.
- Mechoulam R, Hanus L. 2000. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids*, 108(1-2):1-13.

- Mechoulam R, Parker LA, Gallily R. 2002. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol*. Nov;42(11 Suppl):11S-19S. Review.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. 1995. Identification of an endogenous 2- monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 50:83-90.
- Mechoulam R, Varconi H, Ben-Zvi Z, Edery H, Grunfeld Y. 1972. Mechoulam R, Varconi H, Ben-Zvi Z, Edery H, Grunfeld Y. *J Am Chem Soc*, 94(22):7930-1.
- Mechoulam R, Spatz M, Shohami E. Endocannabinoids and neuroprotection. 2002. *Sci STKE*. Apr 23;2002(129):re5. Review.
- Mechoulam R, Peters M, Murillo-Rodriguez E, Hanus LO. 2007. Cannabidiol--recent advances. *Chem Biodivers*, 4(8):1678-92.
- Melis M., Carta S., Fattore L., Tolu S., Yasar S., Goldberg S. R., Fratta W., Maskos U., Pistis M. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptors- α modulate dopamine cell activity through nicotinic receptors. *Biol. Psychiatry* 68, 256–264.
- Meng T, Wang J, Peng H, Fang G, Li M, Xiong B, Xie X, Zhang Y, Wang X, Shen J Discovery of benzhydrylpiperazine derivatives as CB1 receptor inverse agonists via privileged structure-based approach. 2010. *Eur J Med Chem*. Mar;45(3):1133-9.
- Merighi S, Gessi S, Varani K, Simioni C, Fazzi D, Mirandola P, Borea PA. 2012. Cannabinoid CB(2) receptors modulate ERK-1/2 kinase signalling and NO release in microglial cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* Mar;165(6):1773-88.
- Mestre L, Correa F, Arévalo-Martín A, Molina-Holgado E, Valenti M, Ortas G, Di Marzo V, Guaza C. 2005. Pharmacological modulation of the endocannabinoid system in a viral model of multiple sclerosis. *J Neurochem*. Mar;92(6):1327-39.
- Mestre L, Correa F, Docagne F, Clemente D, Guaza C. 2006. The synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 increases COX-2 expression and PGE2 release in murine brain-derived endothelial cells following Theiler's virus infection. *Biochem Pharmacol*. Sep 28;72(7):869-80.
- Mestre L, Iñigo PM, Mecha M, Correa FG, Hernangómez-Herrero M, Loria F, Docagne F, Borrell J, Guaza C. 2011. Anandamide inhibits Theiler's virus induced VCAM-1 in brain endothelial cells and reduces leukocyte transmigration in a model of blood brain barrier by activation of CB1 receptors. *J Neuroinflammation*. Aug 18;8:102.
- Metz GA. 2007. Stress as a modulator of motor system function and pathology. *Rev Neurosci*. 18(3-4):209-22. Review.
- Meyer U, van Kampen M, Isovich E, Flügge G, Fuchs E. 2001. Chronic psychosocial stress regulates the expression of both GR and MR mRNA in the hippocampal formation of tree shrews. *Hippocampus*. 11(3):329-36
- Meyer, S. E., Chrousos, G. P., y Gold, P. W. 2001. Major depression and the stress system: a life span perspective. *Dev. Psychopathol*. 13: 565-580.
- Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A. 2000. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(7):3655-60.
- Mievis S, Blum D, Ledent C. 2011. Worsening of Huntington disease phenotype in CB1 receptor knockout mice. *Neurobiol Dis*. Jun;42(3):524-9.
- Michelson D, Gold PW, Sternberg EM. 1994a. The stress response in critical illness. *New Horiz*. Nov;2(4):426-31. Review.

- Mikics E, Vas J, Aliczki M, Halasz J, Haller. 2009. Interactions between the anxiogenic effects of CB1 gene disruption and 5-HT₃ neurotransmission. *J. Behav Pharmacol.* May;20(3):265-72.
- Miller LL, Ward SJ, Dykstra LA. 2008. Chronic unpredictable stress enhances cocaine-conditioned place preference in type 1 cannabinoid receptor knockout mice. *Behav Pharmacol.* Sep;19(5-6):575-81.
- Miller A, Enlow MB, Reich W, Saxe G. A diagnostic interview for acute stress disorder for children and adolescents. *J Trauma Stress.* 2009 Dec;22(6):549-56.
- Milman G, Maor Y, Abu-Lafi S, Horowitz M, Gallily R, Batkai S, Mo FM, Offertaler L, Pacher P, Kunos G, Mechoulam R. 2006. N-arachidonoyl L-serine, an endocannabinoid-like brain constituent with vasodilatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(7):2428-33.
- Mirescu, C. & Gould, E. 2006. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* 16, 233–238.
- Mizoguchi K, Kunishita T, Chui DH, Tabira T. 1992. Stress induces neuronal death in the hippocampus of castrated rats. *Neurosci Lett.* Apr 13;138(1):157-60.
- Mo FM, Offertaler L, Kunos G. 2004. Atypical cannabinoid stimulates endothelial cell migration via a Gi/Go-coupled receptor distinct from CB1, CB2 or EDG-1. *Eur J Pharmacol*, 489(1-2):21.
- Moghaddam, B. 1993. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J.Neurochem.* 60: 1650-1657.
- Moghaddam B, Bolinao ML, Stein-Behrens B, Sapolsky R. 1994. Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Res.* Aug 29;655(1-2):251-4.
- Molina-Holgado F, Molina-Holgado E, Guaza C, Rothwell NJ. 2002a. Role of CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocytes cultures. *J Neurosci Res*, 67:829-836.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Almazan G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C. 2002b. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *JNeurosci*, 22(22):9742-975.
- Molina-Holgado F., Rubio-Araiz A., García-Ovejero D., Williams R.J., Moore J.D., Arévalo-Martin A., Gómez-Torres O. and Molina-Holgado E.. 2007. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. *Eur. J. Neurosci.* 25, pp. 629–634.
- Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther*, 110(3):371-85.
- Moreira FA, Lutz B. 2008. The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol.* Jun;13(2):196-212. Review.
- Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Cerù MP. 2004. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*, 123(1):131-45.
- Moretti M, Colla A, de Oliveira Balen G, dos Santos DB, Budni J, de Freitas AE, Farina M, Severo Rodrigues AL. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *J Psychiatr Res.* 2012 Mar;46(3):331-40.
- Mukhopadhyay P, Rajesh M, Pan H, Patel V, Mukhopadhyay B, Batkai S, Gao B, Haskó G, Pacher P. 2010. Cannabinoid-2 receptor limits inflammation, oxidative/nitrosative stress, and cell death in nephropathy. *Free Radic Biol Med.* Feb 1;48(3):457-67.
- Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev.* Winter;5(1):25-44. Review.
- Munro S, Thomas K, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. 1993. *Nature.*, 362: 61-5

- Muppidi JR, Arnon TI, Bronevetsky Y, Veerapen N, Tanaka M, Besra GS, Cyster JG. 2011. Cannabinoid receptor 2 positions and retains marginal zone B cells within the splenic marginal zone. *J Exp Med.* Sep 26;208(10):1941-8.
- Murray, F., Smith, D.W. & Hutson, P.H. 2008. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 583, 115–127.
- Musazzi L., Racagni G. and Popoli M., 2011. Environmental stress, glucocorticoids and glutamate release: effects of antidepressant drugs. *Neurochem. Int.*, 59 2, pp. 138–149.
- Myers B, McKlveen JM, Herman JP. 2012. Neural Regulation of the Stress Response: The Many Faces of Feedback. *Cell Mol Neurobiol.*
- Nadler V, Mechoulam R, Sokolovsky M. *Neurosci Lett.* 1993. The non-psychotropic cannabinoid (+)-(3S,4S)-7-hydroxy-delta 6- tetrahydrocannabinol 1,1-dimethylheptyl (HU-211) attenuates N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity in primary cultures of rat forebrain. Nov 12;162(1-2):43-5.
- Nakajima Y, Furuichi Y, Biswas KK, Hashiguchi T, Kawahara K, Yamaji K, Uchimura T, Izumi Y, Maruyama I. 2006. Endocannabinoid, anandamide in gingival tissue regulates the periodontal inflammation through NF-kappaB pathway inhibition. *FEBS Lett.* Jan 23;580(2):613-9.
- Nemeroff, C. B., Widerlov, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C. D., Loosen, P. T., y Vale, W. 1984. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226: 1342-1344.
- Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI. 2008. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *J Neuropsychopharmacol.* 2008 Sep;11(6):851-76.
- Nomura Daniel K., Morrison Bradley E., Blankman Jacqueline L., Long Jonathan Z., Kinsey Steven G., Marcondes Maria Cecilia G., Ward Anna M., Hahn Yun Kyung, Lichtman Aron H., Conti Bruno, Cravatt Benjamin F., 2011. Endocannabinoid Hydrolysis Generates Brain Prostaglandins That Promote Neuroinflammation, *Science* 11 November: Vol. 334 no. 6057 pp. 809-813.
- Núñez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, Gonzalez S, Tolon RM, Romero J. 2004. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse*, 53: 208-213.
- Núñez E, Benito C, Tolón RM, Hillard CJ, Griffin WS, Romero J. 2008. Glial expression of cannabinoid CB(2) receptors and fatty acid amide hydrolase are beta amyloid-linked events in Down's syndrome. *Neuroscience.* Jan 2;151(1):104-10.
- Oddi S, Latini L, Viscomi MT, Bisicchia E, Molinari M, Maccarrone M. 2012. Distinct regulation of nNOS and iNOS by CB2 receptor in remote delayed neurodegeneration. *J Mol Med.* Apr;90(4):371-87.
- Offertáler L, Mo FM, Bátkaí S, Liu J, Begg M, Razdan RK, Martin BR, Bukoski RD, Kunos G. 2003. Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol.* 63:699-705.
- Oka, Kimura, Yamashita and Sugiura. 2009a. Lysophosphatidylinositol induces rapid phosphorylation of p38 mitogen-activated protein-kinase in HEK293 cells expressing GPR55 19th annual symposium of the International Cannabinoid Research Society, ICRS, St. Charles, IL (2009), p. P12.
- Olfe J, Domanska G, Schuett C, Kiank C. 2010. Different stress-related phenotypes of BALB/c mice from in-house or vendor: alterations of the sympathetic and HPA axis responsiveness. *BMC Physiol.* Mar 9;10:2.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasent L, Uhl GR.

- 2006a. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann NY Acad Sci.* Aug;1074:514-36. Review.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Sejal P, Meozzi PA, Myers L, Tagliaferro P, Hope B, Leonard CM, Uhl GR, Brusco A, Gardner E. 2006b. Methods to study the behavioral effects and expression of CB2 cannabinoid receptor and its gene transcripts in the chronic mild stress model of depression. *Methods Mol Med.*; 123:291-8.
- Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Meozzi PA, Myers L, Perchuk A, Mora Z, Tagliaferro PA, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Hope B, Lujilde J, Inada T, Iwasaki S, Macharia D, Teasensfitz L, Arinami T, Uhl GR. 2008. Brain neuronal CB2 cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects. *PLoS One.* Feb 20;3(2):e1640.
- Onaivi ES. 2011. Commentary: Functional Neuronal CB2 Cannabinoid Receptors in the CNS. *Curr Neuropsychopharmacol.* Mar;9(1):205-8. *Neuropsychopharmacology.* 2011 Jun;36(7):1489-504.
- Ortega-Alvaro A, Aracil-Fernández A, García-Gutiérrez MS, Navarrete F, Manzanares J. 2011. Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology.* Jun;36(7):1489-504.
- O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. 2007. *Br J Pharmacol.* Nov;152(5):576-82. Aug 20. Review.
- Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, Futatsubashi M, Kanno T, Ogusu T, Torizuka T. 2005. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol.* Feb;57(2):168-75.
- Ottenweller, J. E. 2000. Animal models (nonprimate) for human stress. *Encyclopedia of stress* 1: 200-205.
- Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C. 2006. "Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab.* 3 (3): 167–175.
- Pacher P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Liu J, Harvey-White J, Brassai A, Járαι Z, Cravatt BF, Kunos G. 2005 Hemodynamic profile, responsiveness to anandamide, and baroreflex sensitivity of mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289(2):H533-41.
- Pacher P, Bátkai S, Kunos G. 2006. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 58(3):389-462.
- Pacher P, Mackie K. 2012. Interplay of cannabinoid 2 (CB2) receptors with nitric oxide synthases, oxidative and nitrative stress, and cell death during remote neurodegeneration. *J Mol Med (Berl).* Apr;90(4):347-51.
- Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I. 2006. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 20(13):2405-7.
- Palazuelos J, Davoust N, Julien B, Hatterer E, Aguado T, Mechoulam R, Benito C, Romero J, Silva A, Guzmán M, Nataf S, Galve-Roperh I. 2008. The CB(2) cannabinoid receptor controls myeloid progenitor trafficking: involvement in the pathogenesis of an animal model of multiple sclerosis. *J Biol Chem.* May 9;283(19):13320-9.
- Palazuelos J, Aguado T, Pazos MR, Julien B, Carrasco C, Resel E, Sagredo O, Benito C, Romero J, Azcoitia I, Fernández-Ruiz J, Guzmán M, Galve-Roperh I. 2009. Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain.* Nov;132(Pt 11):3152-64.
- Pamplona, F.A., and Takahashi, R. N. 2011. Psychopharmacology of the endocannabinoids: far beyond anandamide. *J. Psychopharmacol.* PMID: 21652605.

- Panikashvili D, Mechoulam R, Beni SM, Alexandrovich A, Shohami E. 2005. CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab.* Apr;25(4):477-84.
- Pariente CM, Miller AH. 2001. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry.* Mar 1;49(5):391-404. Review.
- Pariente CM. 2006. The glucocorticoid receptor: part of the solution or part of the problem? *J Psychopharmacol.* Jul;20(4 Suppl):79-84. Review.
- Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Cullinan WE, Hillard CJ. 2004. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology.* Dec;145(12):5431-8.
- Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Hillard CJ. 2005. Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. *Eur J Neurosci.* Feb;21(4):1057-69.
- Patel S, Kingsley PJ, Mackie K, Marnett LJ, Winder DG. 2009. Repeated homotypic stress elevates 2-arachidonoylglycerol levels and enhances short-term endocannabinoid signaling at inhibitory synapses in basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology.* Dec;34(13):2699-709.
- Parmentier-Batteur S, Jin K, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. 2002. Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice. *J Neurosci.* 2002 Nov 15;22(22):9771-5.
- Pazos MR, Tolón RM, Benito C, Rodríguez CF, Gorgojo JJ, Nevado M, Alvarez M, Arias F, Almodóvar F, Fernández MT, Lledó JL, González S, Fernández-Ruiz JJ, Romero J. 2008. Cannabinoid CB1 receptors are expressed by parietal cells of the human gastric mucosa. *J Histochem Cytochem.* May;56(5):511-6.
- Pérez-Rial S, García-Gutiérrez MS, Molina JA, Pérez-Nievas BG, Ledent C, Leiva C, Leza JC, Manzanares. 2009. Aging Increased vulnerability to 6-hydroxydopamine lesion and reduced development of dyskinesias in mice lacking CB1 cannabinoid receptors. *J. Neurobiol* May 2009, 4.
- Pertwee RG. 1997. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther.* 74(2):129-80. Review.
- Pfohl B., Sherman B., Schlechte J., y Winokur, G. 1985. Differences in plasma ACTH and cortisol between depressed patients and normal controls. *Biol.Psychiatry* 20: 1055-1072
- Pertwee R. 2004. Receptors and pharmacodynamics: natural and synthetic cannabiniods and endocannabinoids. Guy G.W., Whittle B.A, Robson P.J, editors. The medicinal uses of cannabis and cannabinoids. London: *Pharmaceutical Press*; p. 103-117.
- Pertwee RG. 2007. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan. *Br J Pharmacol.* 152:984-986
- Pertwee RG. 2008. Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol.* 13(2):147-59.
- Petrosino S, Di Marzo. 2010. V. FAAH and MAGL inhibitors: therapeutic opportunities from regulating endocannabinoid levels. *Curr Opin Investig Drugs.* Jan;11(1):51-62. Review.
- Petty F, McChesney C, Kramer G. 1985. Intracortical glutamate injection produces helpless-like behavior in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* Apr;22(4):531-3.
- Pfohl B, Sherman B, Schlechte J, Winokur G. 1985. Differences in plasma ACTH and cortisol between depressed patients and normal controls. *Biol Psychiatry.* Oct;20(10):1055-72.
- Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ, Makriyannis A. 1999. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(10):5802-7.

- Pittenger and Duman, 2008 C. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33, pp. 88–109. |
- Poland RE, Cloak C, Lutchmansingh PJ, McCracken JT, Chang L, Ernst T. 1999. Brain N-acetyl aspartate concentrations measured by H MRS are reduced in adult male rats subjected to perinatal stress: preliminary observations and hypothetical implications for neurodevelopmental disorders. *J Psychiatr Res*. Jan-Feb;33(1):41-51.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. 2002. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 301(3):1020-4.
- Potashkin JA, Meredith GE. 2006. The role of oxidative stress in the dysregulation of gene expression and protein metabolism in neurodegenerative disease. *Antioxid Redox Signal*. Jan-Feb;8(1-2):144-51
- Price TL, Darby-King A, Harley CW, McLean JH. 1998. Serotonin plays a permissive role in conditioned olfactory learning induced by norepinephrine in the neonate rat. *Behav Neurosci*. Dec;112(6):1430-7.
- Price DA, Martinez AA, Seillier A, Koek W, Acosta Y, Fernandez E, Strong R, Lutz B, Marsicano G, Roberts JL, Giuffrida A. 2009. WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. Jun;29(11):2177-86..
- Pryce G, Ahmed Z, Hankey DJ, Jackson SJ, Croxford JL, Pocock JM, Ledent C, Petzold A, Thompson AJ, Giovannoni G, Cuzner ML, Baker D. 2003. Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis.. *Brain*. 2003 Oct;126(Pt 10):2191-202.
- Qiu BS, Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM. 1999. The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nat Med*. Oct;5(10):1178-82.
- Rachal, P. C., Fleshner, M., Watkins, L. R., Maier, S. F., y Rudy, J. W. 2001. The immune system and memory consolidation: a role for the cytokine IL-1beta. *Neurosci.Biobehav.Rev*. 25: 29-41.
- Rachal Pugh C, Fleshner M, Watkins LR, Maier SF, Rudy JW. 2001. The immune system and memory consolidation: a role for the cytokine IL-1beta. *Neurosci Biobehav Rev*. Jan;25(1):29-41.
- Racz I, Nadal X, Alferink J, Baños JE, Rehnelt J, Martín M, Pintado B, Gutierrez-Adan A, Sanguino E, Manzanares J, Zimmer A, Maldonado R. 2008. Crucial role of CB(2) cannabinoid receptor in the regulation of central immune responses during neuropathic pain. *J Neurosci*. Nov 12;28(46):12125-35.
- Rademacher DJ, Meier SE, Shi L, Ho WS, Jarrahan A, Hillard CJ. 2008. Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. *Neuropharmacology*. Jan;54(1):108-16.
- Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. 2004. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*. 125(1):1-6.
- Radley JJ, Rocher AB, Janssen WG, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. 2005. Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Exp Neurol*. Nov;196(1):199-203.
- Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WG, Liston C, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. 2006. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. Mar;16(3):313-20.
- Radley JJ, Sawchenko PE. 2011. A common substrate for prefrontal and hippocampal inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci* 31:9683–9695.

- Raison, C. L. y Miller, A. H. 2003. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am.J.Psychiatry* 160: 1554-1565
- Raison CL, Capuron L, Miller AH. 2006. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol.* Jan;27(1):24-31.
- Ralevic V. 2003. "Cannabinoid modulation of peripheral autonomic and sensory neurotransmission.". *European journal of pharmacology* 472 (1-2): 1-21.
- Randall MD, Harris D, Kendall DA, Ralevic V. 2002. Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol Ther.* Aug;95(2):191-202. Review.
- Ratka A, Sutanto W, Bloemers M, de Kloet ER. On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology.* 1989 Aug;50(2):117-23.
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Haskó G, Huffman JW, Mackie K, Pacher P. 2008. CB2 cannabinoid receptor agonists attenuate TNF-alpha-induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol.* Jan;153(2):347-57.
- Reul JM, de Kloet ER. 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* Dec;117(6):2505-11.
- Reul, J. M., Labeur, M. S., Wiegers, G. J., y Linthorst, A. C. 1998. Altered neuroimmunoendocrine communication during a condition of chronically increased brain corticotropin-releasing hormone drive. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 840: 444-455.
- Rhen, T. y Cidlowski, J. A. 2005. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N.Engl.J.Med.* 353: 1711-1723.
- Richter A, Löscher W. 1994. (+)-WIN 55,212-2, a novel cannabinoid receptor agonist, exerts antidystonic effects in mutant dystonic hamsters. *Eur J Pharmacol.* Nov 3;264(3):371-7.
- Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Vitoretti LB, Mariano-Souza DP, Quinteiro-Filho WM, Akamine AT, Almeida VI, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Palermone Neto. 2012. Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. *J Eur J Pharmacol.* Mar 5;678(1-3):78-85.
- Riebe CJ, Wotjak CT. 2011. Stress. Jul;14(4):384-97. Review.
- Rinaldi-Carmona M, Prbonnaud V, Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Casellas P, Le Fur G, Herbert JM. 1994 Regulation of 5-hydroxytryptamine2 (5-HT2) receptor expression in cultured rat aortic smooth muscle cells by SR 46349B, a selective 5-HT2 receptor antagonist. *J Biol Chem.* Jan 7;269(1):396-401.
- Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni OJ. 2001. Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci.* Jan 1;21(1):109-16.
- Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier MP, Laborde C, Baron JF, Haffaf Y, Cesari M, Festy F. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol.* 2006 Aug;126(2):177-87.
- Roche, M.; Diamond, M.; Kelly, J.P.; Finn, D.P. 2006. In vivo modulation of LPS-induced alterations in brain and peripheral cytokines and HPA axis activity by cannabinoids. *J. Neuroimmunol.*, 181, 57-67. 125.
- Rock, J. P., Oldfield, E. H., Schulte, H. M., Gold, P. W., Kornblith, P. L., Loriaux, L., y Chrousos, G. P. 1984. Corticotropin releasing factor administered into the ventricular CSF stimulates the pituitary-adrenal axis. *Brain Res.* 323: 365-368.

- Rockwell CE, Snider NT, Thompson JT, Vanden Heuvel JP, Kaminski NE. 2006. Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol Pharmacol*. Jul;70(1):101-11.
- Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM. 2001. Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. *J Neurosci*. Feb 1;21(3):823-33.
- Role Steiner MA, Wotjak CT. 2008. The endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis.. *Prog Brain Res*. 2008;170:397-432.
- Romera C, Hurtado O, Mallolas J, Pereira MP, Morales JR, Romera A, Serena J, Vivancos J, Nombela F, Lorenzo P, Lizasoain I, Moro MA. 2007. Ischemic preconditioning reveals that GLT1/EAAT2 glutamate transporter is a novel PPARgamma target gene involved in neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab*. Jul;27(7):1327-38.
- Romero J, Hillard CJ, Calero M, Rábano A. 2002. Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study. *Brain Res Mol Brain Res*. Apr 30;100(1-2):85-93.
- Ros-Bernal F, Hunot S, Herrero MT, Parnadeau S, Corvol JC, Lu L, Alvarez-Fischer D, Carrillo-de Sauvage MA, Saurini F, Coussieu C, Kinugawa K, Prigent A, Höglinger G, Hamon M, Tronche F, Hirsch EC, Vyas S. 2011. Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 19;108(16):6632-7.
- Ross RA, Coutts AA, McFarlane SM, Anavi-Goffer S, Irving AJ, Pertwee RG, MacEwan DJ, Scott RH. 2001. Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology*. 40(2):221-32.
- Ross RA, Coutts AA, McFarlane SM, Anavi-Goffer S, Irving AJ, Pertwee RG, MacEwan DJ, Scott RH. 2001. Actions of cannabinoid receptor ligands on rat cultured sensory neurones: implications for antinociception. *Neuropharmacology*, 40(2):221-32.
- Ross RA. 2003. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol*, 140(5):790-801.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*. Jan 20;403(6767):316-21.
- Rossi S, De Chiara V, Musella A, Kusayanagi H, Mataluni G, Bernardi G, Usiello A, Centonze D. 2008. Chronic psychoemotional stress impairs cannabinoid-receptor-mediated control of GABA transmission in the striatum. *J Neurosci*. Jul 16;28(29):7284-92.
- Rothman SM, Mattson MP. 2010. Adverse stress, hippocampal networks, and Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*. Mar;12(1):56-70.
- Rubino T, Forlani G, Viganò D, Zippel R, Parolaro D. 2004. Modulation of extracellular signal-regulated kinases cascade by chronic delta 9-tetrahydrocannabinol treatment. *Mol Cell Neurosci*. Mar;25(3):355-62.
- Ruiz-Valdepeñas L, Benito C, Tolón RM, Martínez Orgado JA, Romero J. 2010. The endocannabinoid system and amyloid-related diseases. *Exp Neurol*. Jul;224(1):66-73.
- Russell GM, Henley DE, Leendertz J, Douthwaite JA, Wood SA, Stevens A, Woltersdorf WW, Peeters BW, Ruigt GS, White A. 2010. Rapid glucocorticoid receptor-mediated inhibition of hypothalamic-pituitary-adrenal ultradian activity in healthy males. *J Neurosci*. Apr 28;30(17):6106-15.
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. 2007. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, 152(7):1092-101.

- Sagredo O, García-Arencibia M, de Lago E, Finetti S, Decio A, Fernández-Ruiz J. 2007. Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol Neurobiol.* Aug;36(1):82-91.
- Sagredo O., Gonzalez S., Aroyo I., Pazos M.R., Benito C., Lastres-Becker I., Romero J.P., Tolón R.M., Mechoulam R., Brouillet E., Romero J. and Fernández-Ruiz J., 2009. Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. *Glia*, 57, pp. 1154–1167.
- Sanacora G, Treccani G, Popoli M. 2012. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology.* Jan;62(1):63-77.
- Sánchez C, Galve-Roperh I, Canova C, Bracher P, Guzmán M. 1998. Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett.* Sep 25;436(1):6-10.
- Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE. 1990. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci.* Sep;10(9):2897-902.
- Sapolsky RM. 1996. Stress, Glucocorticoids, and Damage to the Nervous System: The Current State of Confusion. *Stress.* Jul;1(1):1-19.
- Salter M, Duffy C, Garthwaite J, Strijbos PJ. 1996. Ex vivo measurement of brain tissue nitrite and nitrate accurately reflects nitric oxide synthase activity in vivo. *Neurochem.* Apr;66(4): 1683-90.
- Sánchez C, Galve-Roperh I, Rueda D, Guzmán M. 1998. Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol.* Nov;54(5):834-43.
- Sanchez MG, Sanchez AM, Collado B, Malagarie-Cazenave S, Olea N, Carmena MJ, Prieto JC, Diaz-Laviada I I. Expression of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells and in human prostate tissue. *Eur J Pharmacol.* 2005 May 16;515(1-3):20-7.
- Sánchez AJ, González-Pérez P, Galve-Roperh I, García-Merino A. 2006. R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)-pyrrolo-[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone (WIN-2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces encephalitogenic T cell apoptosis: partial involvement of the CB(2) receptor. *Biochem Pharmacol.* 72(12):1697-706.
- Sancho R, Calzado MA, Di Marzo V, Appendino G, Muñoz E. 2003. Anandamide inhibits nuclear factor-kappaB activation through a cannabinoid receptor-independent pathway. *Mol Pharmacol.* Feb;63(2):429-38.
- Santos CM. 2012. New Agents Promote Neuroprotection In Parkinson Models. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* Apr 4.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. 1984. Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct;81(19):6174-7.
- Sapolsky RM. 1985. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: temporal aspects of neuronal vulnerability. *Brain Res.* Dec 16;359(1-2):300-5
- Sapolsky, RM, Krey, LC., & McEwen, BS. 1986. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev*, 7:284-30.
- Sarandol A, Sarandol E, Eker SS, Erdinc S, Vatansever E, Kirli S. 2007. Major depressive disorder is accompanied with oxidative stress: short-term antidepressant treatment does not alter oxidative-antioxidative systems. *Hum Psychopharmacol.* Mar;22(2):67-73.
- Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF. 1999. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, P2UGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 64(2):193-8.

- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE. 1997. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol.* Feb;142(2):278-87.
- Schlicker E, Kathmann M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. 2001. *Trends Pharmacol Sci.* Nov;22(11):565-72. Review.
- Scuderi C, Esposito G, Blasio A, Valenza M, Arietti P, Steardo L Jr, Carnuccio R, De Filippis D, Petrosino S, Iuvone T, Di Marzo V, Steardo L. 2011. Palmitoylethanolamide counteracts reactive astrogliosis induced by beta-amyloid peptide. *J Cell Mol Med.* Jan 21
- Scuderi C, Valenza M, Stecca C, Esposito G, Carratù MR, Steardo L. 2012. Palmitoylethanolamide exerts neuroprotective effects in mixed neuroglial cultures and organotypic hippocampal slices via peroxisome proliferator-activated receptor- α . *J Neuroinflammation.* Mar 9;9:49.
- Schlicker E, Kathmann M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. 2001. *Trends Pharmacol Sci.* Nov;22(11):565-72. Review
- Selye H A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 1998 Spring;10(2):230-1.
- Schloesser, R.J., Lehmann, M., Martinowich, K., Manji, H.K. & Herkenham, M. 2010. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Mol. Psychiatry*, 15, 1152–1163.
- Schmid PC, Kuwae T, Krebsbach RJ, Schmid HHO. 1997. Anandamide and other Nacylethanolamines in mouse peritoneal macrophages. *Chem Phys Lipids*, 87:103-110.
- Shansky and J.H. Morrison, Stress-induced dendritic remodeling in the medial prefrontal cortex: effects of circuit, hormones and rest. 2009. *Brain Res.*, 1293, pp. 108–113.
- Shansky RM, Hamo C, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. 2009. Stress induced dendritic remodeling in the prefrontal cortex is circuit specific. *Cereb Cortex.* 19:2479--2484.
- Sheline YI. 1996. Hippocampal atrophy in major depression: a result of depression-induced neurotoxicity? *Mol Psychiatry.* Sep;1(4):298-9.
- Shie FS, Nivison M, Hsu PC, Montine TJ. 2009. Modulation of microglial innate immunity in Alzheimer's disease by activation of peroxisomeproliferator-activated receptor gamma. *Curr Med Chem.* 16(6):643-51.
- Sheng WS, Hu S, min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson P. 2005. Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta stimulated human astrocytes. *Glia*, 49:211-219.
- Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer SA. 1996. Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci.* Jul 15;16(14):4322-34.
- Shen M. and Thayer S.A.. 1998. The cannabinoid agonist Win, 55, 212-2 inhibits calcium channels by receptor-mediated and direct pathways in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.*, 783, pp. 77–84.
- Sheridan JF, Padgett DA, Avitsur R, Marucha PT. 2004. Experimental models of stress and wound healing. *World J Surg.* Mar; 28(3):327-30.
- Shie FS, Nivison M, Hsu PC, Montine TJ. 2009. Modulation of microglial innate immunity in Alzheimer's disease by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Curr Med Chem.* 16(6):643-51.
- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. 1995. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing, *J Biol Chem.* Feb 24;270(8):3726-31. Erratum in: *J Biol Chem* 1996 Dec 27;271(52):33706.

- Shoemaker JL, Seely KA, Reed RL, Crow JP, Prather PL. 2007. The CB2 cannabinoid agonist AM-1241 prolongs survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis when initiated at symptom onset. *J Neurochem.* Apr;101(1):87-98.
- Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L, Leon A. 1996. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 30;93(9):3984-9.
- Sigel E, Baur R, Rácz I, Marazzi J, Smart TG, Zimmer A, Gertsch J. 2011. The major central endocannabinoid directly acts at GABAA receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 24.
- Smart D, Jonsson KO, Vandevorde S, Lambert DM, Fowler CJ. 2002. 'Entourage' effects of N-acyl ethanolamines at human vanilloid receptors. Comparison of effects upon anandamide-induced vanilloid receptor activation and upon anandamide metabolism. *Br J Pharmacol.* 136(3):452-8.
- Smith AD, Amalric M, Koob GF, Zigmond MJ. 2002. Effect of bilateral 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle on reaction time. *Neuropsychopharmacology.* Jun;26(6):756-64.
- Smith LK, Jadaoui NM, Colwell KL, Katrina Perehudoff S, Metz GA. 2008. Stress accelerates neural degeneration and exaggerates motor symptoms in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* Apr;27(8):2133-46.
- Snider NT, Kornilov AM, Kent UM, Hollenberg PF. 2007. Anandamide metabolism by human liver and kidney microsomal cytochrome p450 enzymes to form hydroxyeicosatetraenoic and epoxyeicosatrienoic acid ethanolamides. *J Pharmacol Exp Ther.* 321(2):590-7.
- Soares P., Campos A. C., Bortoli V. C., Zangrossi H., Jr., Guimaraes F. S., Zuardi A. W. 2010. Intradorsal periaqueductal gray administration of cannabidiol blocks panic-like response by activating 5-HT1A receptors. *Behav. Brain Res.* 213, 225–229.
- Sodhi RK, Singh N, Jaggi AS. 2011. Neuroprotective mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptor agonists in Alzheimer's disease. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* Aug;384(2):115-24.
- Sorrells SF, Sapolsky RM. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain Behav Immun.* 2007 Mar;21(3):259-72.
- Sotiropoulos I, Catania C, Riedemann T, Fry JP, Breen KC, Michaelidis TM, Almeida OF. 2008 Glucocorticoids trigger Alzheimer disease-like pathobiochemistry in rat neuronal cells expressing human tau. *J Neurochem.* Oct;107(2):385-97.
- Sotiropoulos I, Catania C, Pinto LG, Silva R, Pollerberg GE, Takashima A, Sousa N, Almeida OF. 2011. Stress acts cumulatively to precipitate Alzheimer's disease-like tau pathology and cognitive deficits. *J Neurosci.* May 25;31(21):7840-7.
- Spencer RL, Young EA, Choo PH, McEwen BS. Adrenal steroid type I and type II receptor binding: estimates of in vivo receptor number, occupancy, and activation with varying level of steroid. *Brain Res.* 1990 Apr 23;514(1):37-48.
- Stebulis JA, Johnson DR, Rossetti RG, Burstein SH, Zurier RB. 2008. Ajulemic acid, a synthetic cannabinoid acid, induces an antiinflammatory profile of eicosanoids in human synovial cells. *Life Sci.* Nov 7;83(19-20):666-70.
- Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Staub C, Karsak M, Zimmer A, Frossard JL, Mach F. 2005. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature.* Apr 7;434(7034):782-6.
- Stein-Behrens B, Mattson MP, Chang I, Yeh M, Sapolsky R. 1994. Stress exacerbates neuron loss and cytoskeletal pathology in the hippocampus. *J Neurosci.* Sep;14(9):5373-80.

- Steiner H, Bonner TI, Zimmer AM, Kitai ST, Zimmer A. 1999. Altered gene expression in striatal projection neurons in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 11;96(10):5786-90.
- Steiner MA, Marsicano G, Nestler EJ, Holsboer F, Lutz B, Wotjak CT. 2008a. Antidepressant-like behavioral effects of impaired cannabinoid receptor type 1 signaling coincide with exaggerated corticosterone secretion in mice. *Psychoneuroendocrinology*. 33:54—67.
- Steiner MA, Wotjak CT. Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Brain Res*. 2008;170:397-432. Review.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. 1997. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. Aug 21;388(6644):773-8.
- Stella N. 2004. Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia*. Dec;48(4):267-77. Review.
- Stella N. 2009. Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology*. 56 Suppl 1:244-53.
- Stienstra R, Duval C, Müller M, Kersten S. PPARs, Obesity, and Inflammation. *PPAR Res*. 2007; 2007:95974.
- Stuckey J, Marra S, Minor T, Insel TR. 1989. Changes in mu opiate receptors following inescapable shock. *Brain Res*. Jan 2;476(1):167-9.
- Suárez J, Romero-Zerbo SY, Rivera P, Bermúdez-Silva FJ, Pérez J, De Fonseca FR, Fernández-Llebrez P. 2010. Endocannabinoid system in the adult rat circumventricular areas: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol*. Aug 1;518(15):3065-85.
- Sugiura T, Waku K. 2000. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids*. Nov;108(1-2):89-106. Review.
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res*, 45(5):405-46.
- Sugiura T. Physiological roles of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Biofactors*. 2009 Jan-Feb; 35(1):88-97. Review.
- Sun Y, Bennett A. 2007. Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Res*. 2007:23513.
- Sun Y, Alexander SP, Kendall DA, Bennett AJ. 2006. Cannabinoids and PPARalpha signalling. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 6):1095-7. Sun Y, Bennett A. Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Res*, 2007:23513.
- Sun Y, Alexander SP, Kendall DA, Bennett AJ. 2006. Cannabinoids and PPARalpha signalling. *Biochem Soc Trans*. Dec;34(Pt 6):1095-7.
- Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G, Hen R, & Belzung C. 2008 Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol. Psychiatry*, 64, 293–301.
- Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, Palme R, Griebel G, Ibarguen-Vargas Y, Hen R, Belzung C. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol Psychiatry*. 2011 Dec;16(12):1177-88.
- Suvak MK, Barrett LF. 2011. Considering PTSD from the perspective of brain processes: a psychological construction approach. *J Trauma Stress*. 2011 Feb;24(1):3-24.
- Szabo, C. 2003. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol.Lett*. 140-141: 105-112
- Tanasescu R, Gran B, Constantinescu CS. 2012. The endocannabinoid system: a revolving plate in neuro-immune interaction in health and disease. *Amino Acids*. 2012 Feb 26.
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R. 2006. Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology*. Dec;147(12):5549-56.

- Takadera, T., Yumoto, H., Tozuka, Y., y Ohyashiki, T. 2002. Prostaglandin E(2) induces caspase-dependent apoptosis in rat cortical cells. *Neurosci.Lett.* 317: 61-64.
- Telner JJ, Singhal RL. 1984. Psychiatric progress. The learned helplessness model of depression. *J Psychiatr Res.* 1984;18(3):207-15.
- Ternianov A, Pérez-Ortiz JM, Solesio ME, García-Gutiérrez MS, Ortega-Álvaro A, Navarrete F, Leiva C, Galindo MF, Manzanares J. 2012. Overexpression of CB2 cannabinoid receptors results in neuroprotection against behavioral and neurochemical alterations induced by intracaudate administration of 6-hydroxydopamine. *Neurobiol Aging.* 2012 Feb;33(2):421.e1-16.
- Thiemann G, Watt CA, Ledent C, Molleman A, Hasenohrl RU. 2009. Modulation of anxiety by acute blockade and genetic deletion of the CB (1) cannabinoid receptor in mice together with biogenic amine changes in the forebrain. *Behav Brain Res.* 200:60--67.
- Tollefson GD, Greist JH, Jefferson JW, Heiligenstein JH, Sayler ME, Tollefson SL, Koback K. 1994. Is baseline agitation a relative contraindication for a selective serotonin reuptake inhibitor: a comparative trial of fluoxetine versus imipramine. *J Clin Psychopharmacol.* Dec;14(6):385-91.
- Tombaugh GC, Yang SH, Swanson RA, Sapolsky RM. 1992a. Glucocorticoids exacerbate hypoxic and hypoglycemic hippocampal injury in vitro: biochemical correlates and a role for astrocytes. *J Neurochem.* Jul;59(1):137-46.
- Tombaugh GC, Sapolsky RM. 1992b. Corticosterone accelerates hypoxia- and cyanide-induced ATP loss in cultured hippocampal astrocytes. *Brain Res.*, Aug 14;588(1):154-8.
- Tsou K; Patrick S L; Walker J M. 1995. Physical withdrawal in rats tolerant to delta 9-tetrahydrocannabinol precipitated by a cannabinoid receptor. *Eur J Pharmacol* 280:R13-5
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. 1998a. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* Mar;83(2):393-411.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. 1998b. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* Mar;83(2):393-411.
- Tybulewicz VL, Crawford CE, Jackson PK, Bronson RT, Mulligan RC. 1991. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell.* Jun 28;65(7):1153-63.
- Ueda, N.,Tsuboi,K.,Uyama,T.,and Ohnishi, T. 2011. Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Biofactors* 37, 1–7.
- Uno H, Tarara R, Else JG, Suleman MA, Sapolsky RM. 1989. Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates. *J Neurosci.* May;9(5):1705-11.
- Urigüen L, Pérez-Rial S, Ledent C, Palomo T, Manzanares J. 2004. Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology.* Jun;46(7):966-73.
- Urigüen L, García-Gutiérrez MS, Manzanares J. 2011. Decreased GABAA and GABAB receptor functional activity in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *J Psychopharmacol.* Jan;25(1):105-10.
- Vaidya VA. 2000. Stress, depression and hippocampal damage. *J Biosci.* Jun;25(2):123-4.
- Valenti M, Cottone E, Martinez R, De Pedro N, Rubio M, Viveros MP, Franzoni MF, Delgado MJ, Di Marzo V. 2005. The endocannabinoid system in the brain of *Carassius auratus* and its possible role in the control of food intake. *J Neurochem.* Nov;95(3):662-72.
- Valentino, R. J., Foote, S. L., y Page, M. E. 1993. The locus coeruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 697: 173-188

- Valverde O, Torrens M. CB1 receptor-deficient mice as a model for depression. *Neuroscience*. 2012 Mar 1;204:193-206.
- Van Noort JM. Multiple sclerosis: an altered immune response or an altered stress response? *J Mol Med (Berl)*. 1996 Jun; 74(6):285-96
- Van der Stelt S.M., Veldhuis W.B., Bar P.R., Veldink G.A., Vliegthart J.F. and Nicolay K., 2001. Neuroprotection by Delta9-tetrahydrocannabinol, the main active compound in marijuana, against ouabain-induced in vivo excitotoxicity. *J. Neurosci*. pp. 6475–6479.
- Van der Stelt M, van Kuik JA, Bari M, van Zadelhoff G, Leeftang BR, Veldink GA, Finazzi-Agrò A, Vliegthart JF, Maccarrone M. 2002. Oxygenated metabolites of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: conformational analysis and interaction with cannabinoid receptors, membrane transporter, and fatty acid amide hydrolase. *J Med Chem*, 45(17):3709-20.
- Van der Stelt M, Di Marzo V. 2005. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med.* ; 7(1-2):37-50. Review.
- Van Eekelen JA, Rots NY, Sutanto W, de Kloet ER. 1992. The effect of aging on stress responsiveness and central corticosteroid receptors in the brown Norway rat. *Neurobiol Aging*. Jan-Feb;13(1):159-70.
- Van Sickel MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. 2005. *Science* Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. 2005 Oct 14;310(5746):329-32.
- Vasterling JJ, Proctor SP. 2011. Understanding the neuropsychological consequences of deployment stress: a public health framework. *J Int Neuropsychol Soc*. Jan;17(1):1-6.
- Veldhuis WB, van der Stelt M, Wadman MW, van Zadelhoff G, Maccarrone M, Fezza F, Veldink GA, Vliegthart JF, Bär PR, Nicolay K, Di Marzo V. 2003. Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors and lipoxygenases. *J Neurosci*. 2003 May 15;23(10):4127-33.
- Veldhuis JD, Lightman SL. 2010) Rapid glucocorticoid receptor-mediated inhibition of hypothalamic-pituitary-adrenal ultradian activity in healthy males. *J Neurosci* 30:6106–611
- Vesce S, Rossi D, Brambilla L, Volterra A. 2007. Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol*; 82:57-71. Review.
- Viscomi M.T., Oddi S., Latini L., Pasquariello N., Florenzano F., Bernardi G., Molinari M. and Maccarrone M., 2009. Selective CB2 receptor agonism protects central neurons from remote axotomy-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway. *J. Neurosci.*, 29, pp. 4564–4570.
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S. 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*. Aug 1;22(15):6810-8.
- Waksman, Y., Olson, J. M., Carlisle, S. J., and Cabral, G.A. 1999. The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288, 1357–1366.
- Wagner JA, Varga K, Kunos G. Cardiovascular actions of cannabinoids and their generation during shock. *J Mol Med*. 1998 Nov-Dec;76(12):824-36. Review.
- Wagner JA, Járαι Z, Bártkai S, Kunos G. Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB(1) receptors. *Eur J Pharmacol*. 2001 Jul 6;423(2-3):203-10.

- Waksman Y, Olson JM, Carlisle SJ, Cabral GA. 1999. The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 288:1357–1366.
- Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Wade, C., Xie, Y., Kunos, G., Mackie, K., and Stella, N. 2003. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J. Neurosci.* 23, 1398–1405.
- Walter L, Stella N. 2003. Endothelin-1 increases 2-arachidonyl glycerol (2-AG) production in astrocytes. *Glia*, 44:85-90.
- Walter L, Stella N. 2004. Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol.* Mar;141(5):775-85.
- Wamsteeker JJ, Bains JS. 2010. A synaptocentric view of the neuroendocrine response to stress. *Eur J Neurosci.* Dec;32(12):2011-21.
- Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res.* Aug 21;588(2):341-5.
- Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF. 2006. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J Biol Chem.* Dec 1;281(48):36569-78.
- Weinstock M. 2005. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immun.* Jul;19(4):296-308.
- Whewy J, Herzog H, Mackay F. 2007. NPY and receptors in immune and inflammatory diseases. *Curr Top Med Chem.* 7(17):1743-52.
- Whitnall, M. H. (1993). Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog. Neurobiol.* 40: 573-629
- Wilson N, Cadet JL. 2009. Comorbid mood, psychosis, and marijuana abuse disorders: a theoretical review. *J Addict Dis* 28:309–319.
- Woodman R, Lockette W. 2009. Alpha-methyltyrosine inhibits formation of reactive oxygen species and diminishes apoptosis in PC12 cells. *Brain Res.* Nov 3;1296:137-47.
- Wong CS, Cherng CH, Tung CS. 1998. Intrathecal administration of excitatory amino acid receptor antagonists or nitric oxide synthase inhibitor reduced autotomy behavior in rats. *Anesth Analg.* Sep;87(3):605-8.
- Wotherspoon G, Fox A, McIntyre P, Colley S, Bevan S, Winter J. 2005. Peripheral nerve injury induces cannabinoid receptor 2 protein expression in rat sensory neurons. *Neuroscience*, 135(1):235-45.
- WS, Hu S, Min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson PK. 2005. Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Sheng Glia.* 2005 Jan 15;49(2):211-9.
- Yamaguchi T, Kubota T, Watanabe S, Yamamoto T. 2004. Activation of brain prostanoid EP3 receptors via arachidonic acid cascade during behavioral suppression induced by Delta8-tetrahydrocannabinol. *J Neurochem.* Jan;88(1):148-54.
- Yang H, Zhang J, Andreasson K, Chen C. 2008. COX-2 oxidative metabolism of endocannabinoids augments hippocampal synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci.* 37(4):682-95.
- Yang Y, Gozen O, Watkins A, Lorenzini I, Lepore A, Gao Y, Vidensky S, Brennan J, Poulsen D, Won Park J, Li Jeon N, Robinson MB, Rothstein JD. 2009. Presynaptic regulation of astroglial excitatory neurotransmitter transporter GLT1. *Neuron.* Mar 26;61(6):880-94.
- Yehuda R, Golier JA, Tischler L, Harvey PD, Newmark R, Yang RK, Buchsbaum MS. 2007. Hippocampal volume in aging combat veterans with and without post-traumatic stress disorder: relation to risk and resilience factors. *J Psychiatr Res.* Aug;41(5):435-45.

- Yehuda R, Golier JA, Tischler L, Harvey PD, Newmark R, Yang RK, Buchsbaum MS. 2007. Hippocampal volume in aging combat veterans with and without post-traumatic stress disorder: relation to risk and resilience factors. *J Psychiatr Res.* Aug;41(5):435-45.
- Yu M, Ives D, Ramesha CS. 1997. Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 272(34):21181-6.
- Yu HL, Deng XQ, Li YJ, Li YC, Quan ZS, Sun XY. 2011. N-palmitoylethanolamide, an endocannabinoid, exhibits antidepressant effects in the forced swim test and the tail suspension test in mice. *Pharmacol Rep.* May-Jun; 63(3):834-9.
- Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimarães FS and Joca SRL. 2010. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. *Br J Pharmacol.* January; 159(1): 122–128.
- Zarruk JG, Fernández-López D, García-Yébenes I, García-Gutiérrez MS, Vivancos J, Nombela F, Torres M, Burguete MC, Manzanares J, Lizasoain I, Moro MA. 2012 Cannabinoid type 2 receptor activation downregulates stroke-induced classic and alternative brain macrophage/microglial activation concomitant to neuroprotection. *Stroke.* Jan;43(1):211-9.
- Zhang M, Martin BR, Adler MW, Razdan RK, Jallo JI, Tuma RF. 2007. Cannabinoid CB(2) receptor activation decreases cerebral infarction in a mouse focal ischemia/reperfusion model. *J Cereb Blood Flow Metab.* Jul;27(7):1387-96.
- Zhang J, Chen C. 2008. Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons by limiting COX-2 elevation. *J Biol Chem.* Aug 15;283(33):22601-11.
- Zhang M, Adler MW, Abood ME, Ganea D, Jallo J, Tuma RF. 2009. CB2 receptor activation attenuates microcirculatory dysfunction during cerebral ischemic/reperfusion injury. *Microvasc Res.* Jun;78(1):86-94.
- Zhu L, Wu L, Yu B, Liu X. 2011. The participation of a neurocircuit from the paraventricular thalamus to amygdala in the depressive like behavior. *Neurosci Lett.* Jan 13;488(1):81-6.
- Ziegler, C.G.; Mohn, C.; Lamounier-Zepter, V.; Rettori, V.; Bornstein, S.R.; Krug, A.W.; Ehrhart-Bornstein, M. 2010. Expression and function of endocannabinoid receptors in the human adrenal cortex. *Horm. Metab. Res.*, 42, 88-92.
- Zink M, Vollmayr B, Gebicke-Haerter PJ, Henn FA. 2009. Reduced expression of GABA transporter GAT3 in helpless rats, an animal model of depression. *Neurochem Res.* Sep;34(9):1584-93.
- Zink M, Vollmayr B, Gebicke-Haerter PJ, Henn FA. 2010. Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. *Neuropharmacology.* Feb;58(2):465-73.
- Zink M, Rapp S, Donev R, Gebicke-Haerter PJ, Thome J. 2011. Fluoxetine treatment induces EAAT2 expression in rat brain. *J Neural Transm.* Jun;118(6):849-55.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sörgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* Jul 29;400(6743):452-7.